

**Untersuchungen zur Primärstruktur
der Proteinkomponente des
Humanhämoglobins A:
Sequenzanalyse einiger tryptischer
Globinpeptide.**

Brigitte Liebold

Untersuchungen zur Primärstruktur der
Proteinkomponente des Humanhämoglobins A :

Sequenzanalyse einiger tryptischer Globinpeptide.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Brigitte Liebold

aus Gotha

Dezember 1959



5349/60

Referent : Prof. Dr. A. Butenandt.

Tag der mündlichen Prüfung: 16. DEZ. 1959

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. A. B u t e n a n d t in dem Max-Planck-Institut für Biochemie in München in der Zeit von Januar 1958 bis Juli 1959 ausgeführt.

Herrn Professor Dr. A. B u t e n a n d t bin ich für die wohlwollende Förderung und Unterstützung meiner Arbeit zu herzlichem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. G. B r a u n i t z e r habe ich für wertvolle Anregungen und seine stetige Hilfsbereitschaft besonders zu danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Einleitung.....	6

Theoretischer Teil

A. Allgemeine Methodik zur Durchführung der Sequenzstudien an den tryptischen Globinpeptiden.

Darstellung der Peptide.....	10
Isolierung der Peptide.....	12
Prinzip der durchgeführten Sequenzanalysen.....	17

B. Sequenzanalyse einiger tryptischer Peptide

Histidin-Tetra-Peptid.....	20
Tryptophan-Penta-Peptid.....	23
Phenylalanin-Hepta-Peptid.....	29
Hexadeca-Peptid.....	40

C. Angriff der proteolytischen Fermente auf die untersuchten tryptischen Globinpeptide.....

52

Experimenteller Teil

A. Allgemeine Methodik.....	57
B. Durchführung der Versuche an den einzelnen Peptiden.....	63

Zusammenfassung.....	79
Literaturverzeichnis.....	80



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Abkürzungsverzeichnis

Für die Aminosäuren wurden in der Arbeit die von Brand und Edsall (1947) ¹⁾ angegebenen Abkürzungen verwendet.

H Hb A : Human-Hämoglobin A

TMV : Tabakmosaikvirus

MSH : Melanophoren-stimulierendes Hormon

ACTH : Adrenocorticotropes Hormon

DNP- : 2,4-Dinitrophenyl-

DNPOH : 2,4-Dinitrophenol

FDNB : 2,4-Dinitro-1-Fluorbenzol

BEW : n-Butanol / Eisessig / Wasser

Py-Ac-Puffer : Pyridin-Acetat-Pufferlösung

Coll-Ac-Puffer : 2,4,6-Trimethylpyridin-
Acetat-Pufferlösung

E I N L E I T U N G

Bedeutung der Sequenzanalyse für die Ermittlung der Primärstruktur der Globine.

Die Hämoglobine sind einheitliche, chemisch wohl definierte Verbindungen.

Wie die Hämoglobine verschiedener Tierarten unterscheiden sich auch die zahlreichen abnormalen Human-Hämoglobine, die seit der Entdeckung der menschlichen Sichelzellanämie gefunden worden sind, nur wenig in ihrem physico-chemischen Verhalten und in ihrer Aminosäurezusammensetzung. Die verschiedenen Hämoglobine müssen sich somit vornehmlich in der Sequenzfolge ihrer Aminosäuren unterscheiden, und es scheint, daß nur wenige Teilbereiche innerhalb ihrer beiden, in je einem Molekül vorliegenden Polypeptidketten unterschiedlich aufgebaut sind.

Vorausgegangene physikalische und neuere chemische Untersuchungen haben zu der Vorstellung geführt, dass allen Globinen ein gemeinsames Bauprinzip zukommt: Das undissoziierte Hämoglobinpartikel, für das ein Molekulargewicht von 66 800 ermittelt wurde²⁾, dissoziiert im pH-Bereich zwischen 3,5 und 6,0 reversibel in zwei physikalisch identische Untereinheiten vom Molekulargewicht 33 400³⁾. Die röntgenographischen Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass die Globine aus zwei röntgenographisch nicht unterscheidbaren, identischen "Hälften" bestehen⁴⁾. Das ergab sich auch aus der doppelten Symmetrie des undissoziierten Partikels, aus der symmetrischen Lage der Hämreste sowie der Anordnung der Doppelbindungen in den Porphyrinringen⁵⁾.

Neuere im Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass das Partikel vom Molekulargewicht 33 400 die kleinste chemische Untereinheit darstellt⁶⁾. Das chemische Molekulargewicht aller Globine beträgt 33 400, und jedes dieser Partikel besteht aus zwei homologen Peptidketten ("α- und β-Kette"), die durch Salzbindungen und Wasserstoffbrückenbindungen, nicht jedoch durch S-S-Brücken miteinander verknüpft sind. Die Ketten der verschiedenen Globine zeigen analogen Bau: Während die α-Kette bei den verschiedenen Globinen identisch zu sein scheint und die N-terminale Sequenz Val-leu besitzt, kann die β-Kette in ihrer Sequenzfolge unterschiedlich sein und ist damit wahrscheinlich für die Artspezifität verantwortlich.

Entsprechend diesem Bau der Globine aus zwei Ketten tritt bei Pferdeglobin in Lösungen mit kleiner Ionenstärke bei niedrigem pH (3,5 bis 1,5) eine weitere Aufspaltung des Proteins in zwei verschiedene Komponenten auf, die ein Molekulargewicht von je 16 500 besitzen⁷⁾. Dabei werden die Salzbindungen des Moleküls aufgehoben und die beiden Ketten freigelegt. Auch beim Human-Hämoglobin gelang inzwischen die Trennung der beiden Polypeptidketten und die dreissig aus Humanglobin theoretisch zu erwartenden tryptischen Peptide konnten jeweils einer der beiden Ketten zugeordnet werden^{8,9)}.

Zur Ermittlung der Sequenzfolge in den beiden Globinketten wurden methodisch andere Wege eingeschlagen als bisher bei der Konstitutionsaufklärung von Proteinen üblich war. Infolge der Grösse des Moleküls und der Abwesenheit von S-S-Brücken ist es zu mühsam, kleine Bruchstücke aus unspezifischen Hydrolysen zu isolieren und deren Verknüpfung durch weitere enzymatische Abbaureaktionen festzulegen. Dem neuen beim Globin angewandten

Prinzip liegen zwei grosse Teilabschnitte zu Grunde:

1. In der ersten Phase der Untersuchungen über die Struktur des Hämoglobins wurde das Protein nach Abtrennung des Hämrestes reproduzierbar und weitgehend quantitativ durch enzymatische Spaltung in dreissig definierte Peptidabschnitte zerlegt. Dabei wurde von den proteolytischen Fermenten das Trypsin wegen seiner grossen Spezifität zur enzymatischen Hydrolyse herangezogen. Zur erfolgreichen Auftrennung des erhaltenen enzymatischen Hydrolysates in einheitliche Peptide wurden anschliessend mehrere Methoden verwendet und entwickelt¹⁰⁾. Es gelang, alle zu erwartenden Spaltprodukte aufzufinden, präparativ nach einem neuen Verfahren in reiner Form darzustellen¹¹⁾ und ihre Einheitlichkeit durch quantitative Analysen zu sichern⁹⁾. Der erste Teilabschnitt der Arbeiten - die reproduzierbare Spaltung des Globinmoleküls in eine diskrete Zahl definierter Peptide - ist damit im wesentlichen abgeschlossen.

2. Es stellt sich als nächstes die Aufgabe, die Verknüpfung der erhaltenen Peptide in den beiden Ketten zu bestimmen. Zur Klärung dieser Frage gibt es grundsätzlich folgende Möglichkeiten: Statt mit Trypsin abzubauen, kann man das Protein an anderen Stellen seiner Peptidketten hydrolysieren und in diesen neuen Bruchstücken die jeweils enthaltenen tryptischen Teilbereiche feststellen. Zum anderen ist es denkbar, eine der beiden basischen Aminosäuren, an derer C-terminalen Peptidbindung Trypsin angreift, spezifisch so zu blockieren, dass die Isolierung homologer höherer Spaltprodukte durchführbar wird. Aus diesen könnten nach ihrer Reindarstellung und Entfernung der blockierenden Gruppe die zwei jeweilig gekoppelten Peptide durch erneuten tryptischen Abbau erhalten werden.

Beide Arbeitsrichtungen werden in ihrer Durchführung durch die Kenntnis der Sequenzfolge in den tryptischen Peptiden erleichtert.

In der vorliegenden Arbeit wurden systematische Studien über die Sequenzfolge der Aminosäurereste im menschlichen Hämoglobin A durchgeführt. Die Ermittlung der Folge der Aminosäuren in den erhaltenen dreissig tryptischen Globinpeptiden wurde mit der Festlegung der Reihenfolge der Reste in einem Tetra-, Penta- und Hepta-Peptid begonnen. Ausserdem wurde die N-terminale Sequenz eines Arginylpeptides, das 13 Aminosäurereste enthält, bestimmt und ein weiteres Peptid mit 16 Aminosäureresten durch Ermittlung von 9 Aminosäureresten in ihrer Lage am N- und C-terminalen Ende des Peptides untersucht. Von den etwa 300 Aminosäureresten des Globins wurden hiermit 28 Reste in ihrer Folge innerhalb der tryptischen Peptide ermittelt.

Die vorliegenden Sequenzen besitzen für die Ermittlung der Gesamtstruktur zusätzlich Bedeutung, da auf Grund der Kenntnis ihrer Aminosäurefolge eine spätere Zuordnung der tryptischen Peptide innerhalb der Peptidketten des Gesamt-moleküls wesentlich erleichtert wird.

Theoretischer Teil

A. Allgemeine Methodik zur Durchführung der Sequenzstudien an den tryptischen Spaltprodukten des Globins.

Darstellung der Peptide.

Zwei Voraussetzungen sind entscheidend für die erfolgreiche Durchführung von Sequenzstudien an Peptiden: Sie müssen aus dem enzymatischen Abbau des Proteins reproduzierbar gewonnen werden und in einheitlicher Form isolierbar sein. Deshalb sind bei den Arbeiten am Hämoglobin zunächst optimale Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse des Globins mit Trypsin ausgearbeitet worden.¹²⁾ Die Ergebnisse, die durch Untersuchung der Einwirkung des Fermentes auf natives kristallisiertes Hämoglobin, auf natives Globin sowie auf mit Harnstoff denaturierte Hämoglobin- und Globinpräparate gewonnen wurden, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1.) Die Angreifbarkeit des Proteins durch Trypsin erhöht sich, wenn vor der enzymatischen Hydrolyse der Hämrest vom Protein abgetrennt wird. Es ist nicht ohne weiteres zu entscheiden, ob das nach Anson und Mirsky dargestellte Globin¹³ infolge Denaturierung oder wegen der Entfernung der prostetischen Gruppe leichter dem enzymatischen Abbau unterliegt. Es ist anzunehmen, dass die Stabilisierung des Hämoglobinpartikels auch durch das Häm erfolgt, das hier in gewisser Hinsicht die Funktion der S-S-Brücken bei anderen Proteinen ersetzt, sodass durch seine Entfernung eine ähnlich leichte Spaltbarkeit durch das

Enzym erzielt wird, wie durch Sprengung der S-S-Brücken bei anderen Proteinen.

2.) Wie von anderen Proteinen bekannt, die in nativem Zustand durch Trypsin nicht oder nur schlecht gespalten werden (TMV¹⁴⁾, Ribonuclease¹⁵⁾, Lysozym¹⁶⁾), wird auch das Hämoglobin nach der Denaturierung wesentlich leichter angegriffen. Bei Proteinen, die kein Tryptophan enthalten (Insulin, Ribonuclease) ist zur Denaturierung die Oxydation mit Perameisensäure besonders geeignet, wobei durch gleichzeitige Spaltung der S-S-Brücken eine Entfaltung der Peptidketten erzielt wird. Humanhämoglobin A enthält jedoch Try und keine S-S-Brücken. Die Stabilisierung des Moleküls erfolgt durch Salzbindung des Häms, durch interne Helix-Wasserstoffbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen der Tertiärstruktur und durch interpeptidale Salzbindungen. Daher erwies sich eine Denaturierung des Globinpartikels mit Harnstoff als besonders geeignet. Das bei pH 4-5 in 8-molarer Harnstofflösung dargestellte wasserlösliche, denaturierte Globin liegt bei pH 8, dem pH-Optimum des Trypsins, in feinverteilter Suspension vor und ist fermentativ leicht angreifbar.

3.) Die Spaltung des Globins mit Trypsin bei pH 8,0 erfolgt nur dann spezifisch, wenn das Ferment zur Einschränkung seiner chymotryptischen Wirksamkeit mit n/16 Salzsäure¹⁸⁾ 18 h bei 37° vorbehandelt ist. Wie aus neueren Aminosäureanalysen¹⁷⁾ hervorgeht, enthält das Globinmolekül 21-22 Lysyl- und 6 Arginylreste. Bei quantitativer Spaltung müssten daher im Autotitrator - der Spaltung von etwa 28 Peptidbindungen entsprechend - 28-29 Mol Natronlauge pro Mol Protein verbraucht werden. Maximal wurden 21-22 Mol Natronlauge pro Mol Globin titrimetrisch ermittelt. Dieser Wert muß als optimal angesehen werden, da die Ausbeute nach der Oxydation mit Perameisensäure ebenfalls 22 Mol

entspricht. Die Untersuchungen an tryptischen Hydrolysaten nach 24stündiger Reaktionszeit ergaben, daß die Spaltung spezifisch verlaufen ist: Im Hydrolysat konnten nur zwei Lysin- und Arginin-freie Peptide nachgewiesen werden, das Di-Peptid Tyrosyl-Histidin, das die C-terminale Sequenz der β -Kette darstellt und ein Peptid der Bruttozusammensetzung (Glu, Ala, Gly), das als C-terminale Sequenz der anderen Kette in Frage kommt.

Isolierung der Peptide.

Da nicht zu erwarten war, daß sämtliche tryptische Peptide mit einem Verfahren allein erfasst werden könnten, wurden sie nach mehreren Methoden aus dem enzymatischen Ansatz isoliert.

Ein Teil der Peptide ließ sich in Form der DNP-Derivate einheitlich darstellen. Das tryptische Hydrolysat wurde nach Levy¹⁹⁾ mit FANB umgesetzt und die Reaktionslösung nach Entfernung des überschüssigen Reagenses angesäuert. Die Peptide wurden durch fraktionierte Extraktion mit Äther und Essigester vorgetrennt und die in der wässrigen Phase zurückbleibenden D-P-Peptide durch Rotationsverdampfen gewonnen. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen D-P-Peptide wurden verteilungschromatographisch am Papier isoliert (vergl. Abb. 1) und pherographisch gereinigt. (vergl. Abb. 2)

Bei den beiden anderen angewandten Verfahren wurden die tryptischen Peptide auf Grund ihrer verschiedenen elektrochemischen Eigenschaften durch Ionenaustauscher getrennt. 2,3 der theoretisch zu erwartenden Peptide konnten durch Trennung des tryptischen Hydrolysates nach dem

Bande:

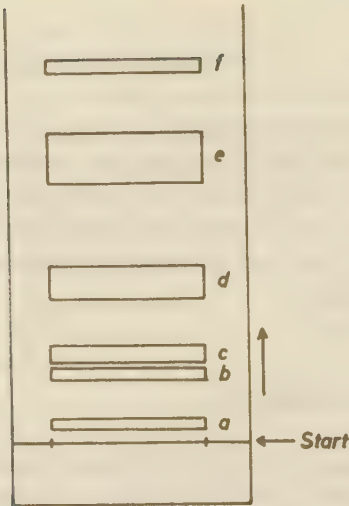


Abb. 1 1-D-Chromatographie der Essigesterfraktion der DNP-Peptide aus dem tryptischen Hydrolysat des Globins von krist. H Hb A .

Lösungsmittel: iso- Amyl-alkohol (0,1% NH_3 gesättigt) + 10% N,N'- Dimethylharnstoff.

Laufzeit: 2 1/2 Tage.

DNP-Peptidbanden : a, b, c, d, e und f.

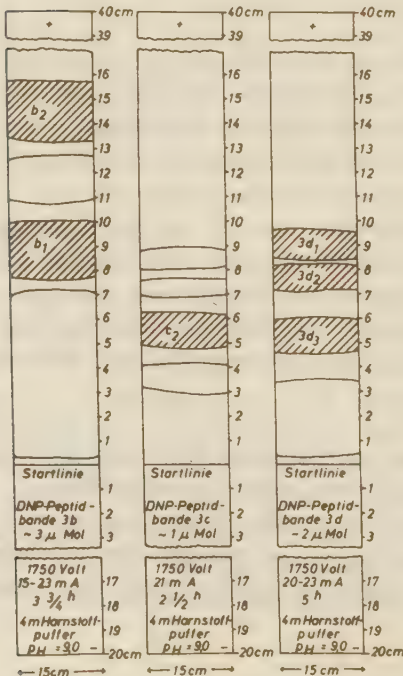


Abb. 2 Darstellung der reinen DNP-Peptide b_1 , c_2 , d_1 , d_2 , d_3 durch elektrophoretische Rechromatographie der DNP-Peptidbanden b, c und d. Versuchsbedingungen: 44 Volt/cm , 15-25 mA, 4 m Harnstoffpuffer, $\text{pH} = 9,0$, Laufzeit: 2 1/2 bis 5 Stunden.

von Stein und Moore entwickelten Verfahren gewonnen werden¹⁰⁾. Die im sauren aufgetragenen Peptide wurden hierbei als Träger einer positiven Nettoladung durch Gradientenelution mit steigendem pH-Wert an einem Kationenaustauscher zum Wandern gebracht (vergl. Abb. 3). Bei diesem Verfahren, bei dem die Peptide in der Reihenfolge Saure-Neutrale-Basische- eluiert werden, überlagern sich jedoch dem reinen Austauscheffekt nicht ionische Wechselwirkungen der Peptide mit dem aromatischen Träger, sodaß etliche Peptide auf dem Harz "hängenbleiben".

Deshalb wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, bei dem die spezifische Wechselwirkung der Peptide mit dem Trägermaterial weitgehend herabgesetzt ist. In Umkehrung vorstehender Methode wurden die bei pH 8,0 aufgetragenen Peptide an dem Anionenaustauscher Dowex 1 X2 (Acetatcyclus) mittels ihrer weitgehend dissoziierten Carboxylgruppen durch Gradientenelution mit fallendem pH-Wert unter Verwendung von flüchtigen Acetatpufferlösungen aufgetrennt.¹¹⁾ Während nach dem Stein und Moore-Verfahren die Peptide zur weiteren Untersuchung erst entsalzt werden mussten, konnten sie nach der Dowex 1 X2-Methode direkt in den Fraktionen nach deren alkalischer Hydrolyse mittels quantitativer Ninhydrinbestimmung²⁰⁾ ermittelt und weiter untersucht werden.

Da alle Spaltprodukte der tryptischen Hydrolyse des Hämoglobins A nach diesem Verfahren besonders leicht in präparativen Masse gewonnen werden konnten, wurden sie zur Sequenzanalyse vorzugsweise nach dieser Methode isoliert. Abb. 4 gibt die Verteilung aller tryptischer Globinpeptide auf einzelne Fraktionen in einem typischen Säulenchromatogramm wieder.

Die zur Sequenzanalyse verwendeten Peptide wurden durch

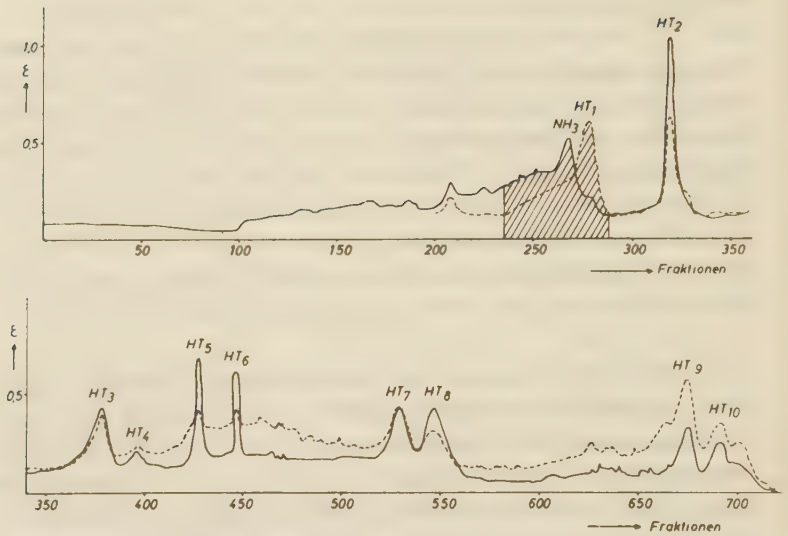


Abb.3 Chromatographische Analyse der tryptischen Peptide aus dem Globin des krist. H Hb A über Dowex 50 X2 .

Versuchsbedingungen:

Säulenmaße 150 x 3 cm, Temperatur 35°

50-60 μ Mol Globin (1,6-1,9 g)

Gradient: linear. Puffer 1: 0,2 m Na^+ , 2m CH_3COO^- ,

Puffer 2: 2 m Na-Acetat.

Durchflussgeschwindigkeit: 80 ml/h .

Ausgezogene Kurve: direkte Ninhydrinfarbe der Fraktionen
gestrichelte Kurve: Ninhydrinfarbe nach alkalischer Hydrolyse. Abszisse: Fraktionen zu 20 ml.

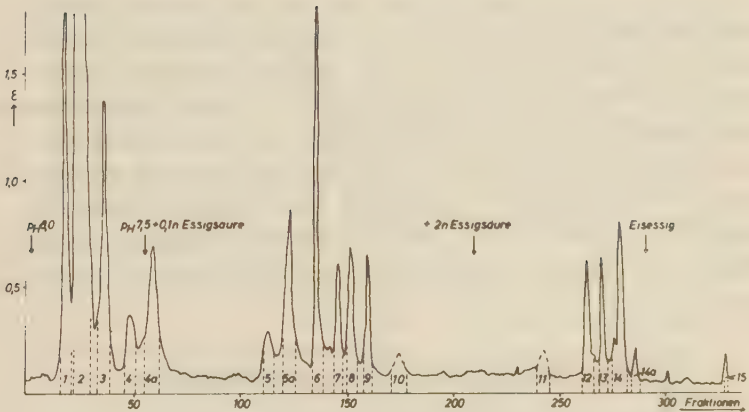


Abb.4 Chromatographische Analyse der tryptischen Peptide aus dem Globin des krist. H Hb A über Dowex 1 X2 , 200 bis 400 mesh.

Versuchsbedingungen:

Tryptische Spaltung von 25 μ Mol Globin .

Säulenmasse: 150 x 2 cm, Temperatur: 35°

Pufferlösungen:

Start : 1% Coll-Ac-Puffer, $p_H = 8,1$

I. Gradient: (1% Coll + 1% Py-Ac-Puffer, $p_H 7,5$) + 0,1 n HAc.

II. Gradient: (" ") + 2 n HAc.

Abschluss: Eisessig .

Durchflussgeschwindigkeit: 35 ml / h .

Ausgezogene Kurve : Ninhydrinfarbe der Fraktionen.

Verteilungsschromatographie am Papier in einheitlicher Form gewonnen und hochspannungselektrophoretisch gereinigt.

Es wurden zunächst nur solche Peptide zur Untersuchung ihrer Sequenz ausgewählt, die nach allen drei Verfahren isoliert werden konnten, da bei Beginn der Arbeit noch nicht alle tryptischen Spaltprodukte erfasst worden waren. Inzwischen gelang, wie oben erwähnt, die Zerlegung des Globinmoleküls in seine beiden Peptidketten und weitgehend die Zuordnung der einzelnen tryptischen Peptide zu einer der beiden Ketten. Deshalb wurden schliesslich zunächst die Peptide der β -Kette zur Sequenzanalyse ausgewählt.

Prinzip der durchgeführten Sequenzanalysen

Im allgemeinen nutzt man zur Sequenzanalyse eines Peptides analog der Konstitutionsermittlung eines Proteins die unterschiedliche Labilität der Peptidbindungen aus und spaltet das Molekül möglichst verschieden in kleine Bereiche auf, isoliert und analysiert die erhaltenen Spaltprodukte und erhält durch Vergleich aller Kenntnis von der Gesamtstruktur des Peptids. Neben sauren unspezifischen Spaltungen bewährten sich enzymatische Hydrolysen, insbesondere mit Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und Subtilisin.

Im Falle des Hämoglobins musste - wie bereits dargelegt - wegen der Grösse des Moleküls der Gesamtpeptidverband zunächst in Peptiduntereinheiten zerlegt werden, um eine erfolgreiche Konstitutionsermittlung zu gewährleisten. Dadurch blieben für Sequenzstudien dieser Spaltprodukte, die bis zu 40-50 Aminosäurereste pro Peptid enthalten können, neben stufenweisen Abbaumethoden und sau-

ren Hydrolysen nur noch enzymatische Hydrolysen mit Chymotrypsin, Pepsin und Subtilisin übrig.

Chymotrypsin und Pepsin sind in ihrer Aktivität beide vornehmlich an das Vorhandensein aromatischer Reste im Peptid gebunden und obwohl sie, wie neuere Untersuchungen ergeben haben, keine ganz strenge Spezifität aufweisen, ergänzen sie sich in ihrer Anwendung auf die Zerlegung von Peptiden nur bedingt. Deshalb waren sie zu der eindeutigen Sequenzbestimmung der tryptischen Globinpeptide allein meist unzureichend.

Subtilisin andererseits, das im allgemeinen Peptide in Di- bis Tetrapeptide zerlegt, ist in seiner Wirkung trotz seines breiten Spezifitätsbereiches auch an das Vorhandensein bestimmter Bindungen im Peptidverband gebunden: Es ergänzte daher die anderen enzymatischen Spaltungen nur zum Teil. Größere tryptische Globinpeptide wurden durch Subtilisin in eine nicht leicht übersehbare Zahl von Partialpeptiden zerlegt, die dann schwierig voneinander zu trennen waren. dagegen gelang es häufig, Partialpeptide, die aus den größeren tryptischen Globinpeptiden durch chymotryptischen oder peptischen Abbau isoliert wurden, mit diesem Ferment weiterzuspalten. War ein Peptid-Bruchstück gegen Subtilisin resistent, so wurde es mit Salzsäure nachgespalten oder in Ergänzung dazu durch stufenweisen Abbau nach Edman oder durch Partialhydrolyse des DNP-Peptids näher analysiert. Zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäure dienten Edman-Abbau²¹⁾ oder DNP-Methode¹⁹⁾. Das jeweilig C-terminale Peptidende wurde durch Einwirkung von Carboxypeptidase oder nach Hydrazinolyse²²⁾ des Peptids festgelegt.

Entscheidend für die Sequenzanalyse insbesondere bei den tryptischen Globinpeptiden ist es demnach, durch günstige

Kombination der möglichen Partialhydrolysen das Peptid in solche Partialpeptide aufzuspalten, deren Sequenz sich ermitteln lässt. Dafür kann jedoch kein allgemeines Schema aufgestellt werden, sondern je nach Peptid und der in ihm enthaltenen Aminosäuren ergeben sich andere Methoden, die massgeblich von der relativen Nachbarschaft der einzelnen Aminosäuren sowie ihrer Verteilung und Anhäufung im Peptid abhängig sind.

Die aus den tryptischen Globinpeptiden dargestellten Partialpeptide konnten ebenfalls nicht nach einem allgemeinen Verfahren getrennt werden. Vielmehr musste die jeweilig geeignete Kombination der zur Verfügung stehenden Methoden gefunden werden. Während Partialpeptide früher vorwiegend durch absorptionschromatographische Verfahren an Säulen getrennt wurden, werden heute Hochspannungselektrophorese in Kombination mit verteilungschromatographischen Methoden am Papier im "Fingerprintverfahren"²³⁾ herangezogen. Hierfür eigneten sich jedoch nur Partialgemische solcher tryptischer Globinpeptide, in denen saure und basische Reste enthalten sind. Für die Wahl des geeigneten Fermentes ergab sich daraus die Forderung, daß durch seine Einwirkung saure und basische Teilbereiche des Moleküls getrennt werden müssen. Waren im Peptid neben der C-terminalen basischen Aminosäure dagegen nur neutrale Reste enthalten, gelang die Trennung seiner Partialpeptide elektrophoretisch nur teilweise nach mehreren Stunden Laufzeit. Hier wurden entweder verteilungschromatographische Verfahren herangezogen oder Pherogramme im Neutralbereich mit flüchtigen Puffern durchgeführt. Da der pK -Wert der α - NH_2 -Gruppen der Peptide 7,4 beträgt, war zu erwarten, daß infolge der verschiedenen Dissoziation der NH_2 -Gruppen der einzelnen Peptide in diesem pH -Bereich eine elektrophoretische Differenzierung der neu-

tralen Peptide möglich ist. Für große Neutralpeptide erhöhten sich auch hier die Wanderungszeiten sehr, sodaß es günstiger erscheint, falls deren weitere Zerlegung in kleine Peptide misslingt, solche Partialpeptidgemische über Ionenaustauscher mit flüchtigen Pufferlösungen zu trennen.

B. Sequenzanalyse einiger tryptischer Peptide.

Sequenz eines Histidin-Tetra-Peptides.

(MG = 465,50)

Gewinnung des Peptides:

DNP-Methode: Das Peptid wurde aus der Essigesterfraktion nach Abtrennung der sauren Peptide durch 1-D-Chromatographie im iso-Amylalkohol-System¹⁰⁾ unter Zusatz von 15% N, N'- Dimethylharnstoff gewonnen und im Harnstoffpuffer elektrophoretisch gereinigt: Peptid A. ²⁴⁾

Stein und Moore-Methode: Das Peptid wurde aus Gipfel HT₉ durch elektrophoretische Reinigung gewonnen²⁵⁾ (Vergl. Abb.3).

Dowex 1 X2-Verfahren: Das Peptid fiel bei der Entwicklung des Säulenchromatogramms in Fraktion XX/2 an (Vergl. Abb.4) und wurde daraus durch 1-D-Chromatographie im Partridge-System²⁶⁾ isoliert: Peptid XX/2/1.

Kettentrennung: Das Peptid gehört der β -Kette an.

Prüfung auf Reinheit:

Papierchromatographisch, 1-dimensional wandert es im Partridge-System einheitlich, ebenso verhält es sich in

der Elektrophorese.

Als N-terminale Aminosäure wurde wie früher nach der DNP-Methode Alanin ermittelt²⁴⁾, das als DNP-Derivat im 2-D-Chromatogramm nach Levy^{27,28)} einheitliche Wanderung zeigte.

Die Bruttozusammensetzung des Peptids wurde nach seiner Totalhydrolyse durch 2-D-Chromatographie der Aminosäuren zu: Ala 1x, Gly 1x, His 1x, Lys 1x ermittelt. Bei einer Menge von 0,2 μ mol aufgetragener Substanz je Aminosäure waren im Chromatogramm keine Verunreinigungen durch andere Aminosäuren enthalten.

Ausserdem wurde das Verhältnis von His zu Lys nach der Methode von Stein und Moore²⁹⁾ im Amino-Acid-Analyzer quantitativ bestimmt:

	<u>μMole:</u>	<u>Reste pro Mol:</u>
His:	0,333	1,02
Lys:	0,313	0,97

Da Alanin als N-terminale und Lysin als C-terminale Aminosäure vorliegen, ergeben sich nur zwei Möglichkeiten für die Folge der Reste im Peptid:

1. Ala-Gly-His-Lys oder
2. Ala-His-Gly-Lys.

Partialhydrolysen:

1.) Das Peptid wurde einer unspezifischen Hydrolyse mit 12 n Salzsäure (44 h bei 37°) unterworfen und die dabei erhaltenen Partialpeptide im Fingerprintverfahren aufgetrennt (vergl. Abb.5). Sie wurden durch Entwicklung mit einer verdünnten Ninhydrinlösung schwach sichtbar gemacht, und mittels Sprühreagens auf enthaltenes Histidin geprüft.

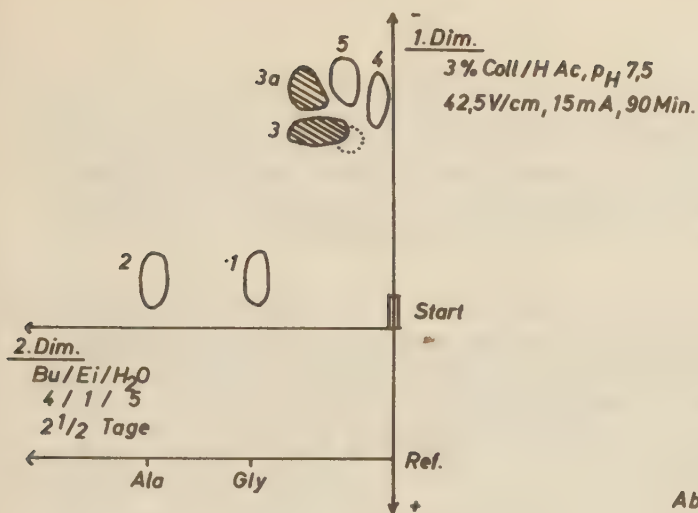


Abb. 5a

⊗ = Sprühtest auf Histidin positiv

unspez. Hydrolyse	Nr.	Aminosäure-zusammensetzung			
freies Peptid (12n HCl, 44 Std., 37°)	5				Lys
	1			Gly	
	4			Gly	Lys
	3a		His		
	2	Ala			
	3	Ala	His		
DNP-Peptid (12n HCl, 15 Min., am Rückfluss)	6				ε-DNP-Lys
	7			Gly	ε-DNP-Lys
	8	DNP-Ala			
Sequenz : Ala - His - Gly - Lys					

Abb. 5b

Abb. 5 Saure Partialhydrolyse des tryptischen His-Tetra-Peptides des Globins aus krist. H Hb A.
Versuchsbedingungen: 12 n HCl , 44 h bei 37°
5a: Trennung der Partialpeptide im Fingerprint.
5b: Aminosäurezusammensetzung der Partialpeptide.

Die mit verdünnter Essigsäure vom Papier eluierten Peptide wurden total hydrolysiert und auf enthaltene Aminosäuren im 1-D-Chromatogramm geprüft. Die Analysen der isolierten Spaltprodukte sind in Abb.5 wiedergegeben:

2.) 1,5 μ mol DNP-Peptid wurden mit rauchender Salzsäure 15 Min. am Rückfluss erhitzt und die entstandenen Spaltprodukte im 2-D-Chromatogramm getrennt. Die erhaltenen Produkte waren im wesentlichen:

Partialpeptid: Gly- ϵ -DNP-Lys, freies ϵ -DNP-Lys und DNP-Ala. (vergl. Abb.5)

Aus der Isolierung des Dipeptids Ala-His und Gly-Lys bei der Partialhydrolyse des Peptids und der Isolierung des Dipeptids Gly- ϵ -DNP-Lys nach partieller Hydrolyse des DNP-Peptids folgt die Sequenz von Peptid λ /2,1 entsprechend Möglichkeit 2:

Ala-His-Gly-Lys

Sequenz eines Tryptophan-Penta-Peptides.

(MW = 603,66)

Gewinnung des Peptides:

DNP-Methode: Das Peptid erwies sich identisch mit dem nach der DNP-Methode aus der Essigesterfraktion durch Chromatographie im iso-Amylalkohol-System und durch elektrophoretische Wanderung im Harnstoff-Puffer isolierten Peptid d_2^{24}) (vergl. Abb.1 und 2).

Stein und Moore-Methode: Das Peptid war im alkalischen Eluat enthalten und wurde daraus durch Kombination von Pherographie und Chromatographie rein dargestellt²⁵⁾.

Dowex 1 X2-Verfahren: Das Peptid wurde aus Fraktion XX, 4 erhalten. Es konnte durch Elektrophorese in Py-Ac-Puffer, pH 6,4 rein dargestellt werden.

Kettentrennung: Das Peptid gehört zur α -Kette.

Prüfung auf Reinheit:

Das Peptid zeigte im Partridge-System einheitliche Wanderung. Als seine N-terminale Aminosäure wurde - analog wie bei dem nach der DNP-Methode isolierten Peptid - Alanin ermittelt, dessen DNP-Derivat im 2-D-Chromatogramm nach Levy einheitlich wanderte.

Das DNP-Peptid enthielt, wie früher gezeigt wurde²⁴⁾, nach der Totalhydrolyse neben DNP-Ala noch folgende Aminosäuren: Gly 1x, Ala 1x, Lys 1x. Das 2-D-Chromatogramm zeigte keine Verunreinigungen durch andere Aminosäuren. Ausserdem enthielt das Peptid noch Tryptophan, wie die positive Reaktion mit dem Ehrlichschen Reagens des intakten, freien Peptides ergab. Die im DNP-Peptid enthaltenen zwei Ala-Reste wurden im freien Peptid folgendermaßen reproduziert:

1.) Das Peptid wurde total hydrolysiert und seine Aminosäuren als DNP-Derivate nach der Levy-Methode²⁸⁾ quantitativ ausgemessen. Dabei ergab sich nach 24-stündiger Hydrolyse das Verhältnis von Ala zu Gly wie 1,48:1,0.

2.) Wurde dagegen das DNP-Derivat des Peptides total hydrolysiert, seine DNP-Endgruppe (DNP-Ala) mit Äther abgetrennt und die restlichen wasserlöslichen Aminosäuren in ihre DNP-Derivate überführt, so ergab sich das quantitative Verhältnis von Ala zu Gly wie 1,02 : 0,98.

Als zusätzliches Kriterium für die Reinheit des Peptides

wurde seine Gly- und Lys-Menge quantitativ ermittelt. Dazu wurden aliquote Teile des Totalhydrolysates des Peptids im Amino-Acid-Analyzer auf die basische und saure Säule aufgebracht und folgendes Verhältnis für Gly und Lys gefunden:

Gly zu Lys wie 1,06 : 0,93.

Partialhydrolysen:

1.) Spezifische enzymatische Hydrolyse mit Chymotrypsin:

Die Anwesenheit von Tryptophan im Peptid machte seine enzymatische Spaltung mit Chymotrypsin wahrscheinlich. Für die dabei zu erwartenden zwei Spaltprodukte waren hinsichtlich der Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld zwei Möglichkeiten gegeben:

a) Befindet sich das Try an vorletzter Stelle im Peptid, müsste bei Angriff des Fermentes an der C-terminalen Try-Peptidbindung ein neutrales Tetrapeptid und freies Lysin auftreten, letzteres muß mit einem R_F -Wert = 1 (bez. auf Lys) kathodisch wandern.

b) Befindet sich dagegen zwischen dem Try und Lys noch eine oder zwei der beiden übrigen neutralen Aminosäuren, tritt Aufspaltung in ein neutrales Peptid des N-terminalen Peptidendes auf, und ausserdem entsteht ein basisches Peptid, das mit einem R_F -Wert kleiner als 1 (bez. auf Lys-1) kathodisch wandern muß.

Die enzymatische Hydrolyse wurde unter optimalen Bedingungen mit 3 μ Mol Peptid bei einem Enzym-Substrat-Verhältnis 15:100 (Gewichtsverhältnis) 4 h bei pH 8,0 vorgenommen. Die erhaltenen Partialpeptide konnten in der Hochspannungselektrophorese mit Py-Ac-Puffer, p_H 6,3 getrennt werden und entsprechend Möglichkeit b) wurden zwei Peptide isoliert:

Partialpeptid C₁: R_F-Wert 0,18 (bez. auf Lys=1), kathodisch. Es zeigte positive Reaktion mit Ehrlich's Reagens und enthielt nach seiner Elution mit Wasser und anschließender Totalhydrolyse als einzige Aminosäure Alanin (Try wird bei saurer Hydrolyse zerstört).

Partialpeptid C₂: R_F-Wert: kleiner als 1 (0,8 bez. auf Lys=1), kathodisch. Es reagierte Try-negativ und enthielt nach Elution mit Wasser und Totalhydrolyse nur Gly und Lys.

Die Ergebnisse wurden mehrere Male reproduziert und der Gehalt an Try im Spaltstück C₁ durch Hydrazinolyse des Partialpeptids geprüft. Dabei ließ sich Try chromatographisch 1-dimensional im Partridge-System mit Ninhydrin schwach positiv nachweisen. Dieser Versuch machte es wahrscheinlich, daß Try die C-terminale Aminosäure des vorderen Partialpeptids in Übereinstimmung mit der für Chymotrypsin zu erwartenden Aktivität ist. Danach würde den Aminosäuren folgende Positionen im Peptide zuzuordnen sein:

1	2	3	4	5
Ala	-Ala	-Try	-Gly	-Lys

2.) Unspezifische enzymatische Hydrolyse mit Subtilisin:

Um die bei der chymotryptischen Spaltung erzielten Ergebnisse zusätzlich zu sichern, wurde versucht, die Alanyl-Alanin-Sequenz zu erfassen. Prinzipiell müsste sich dafür die peptische Hydrolyse des Pentapeptids eignen, doch würden abgesehen von der geringfügigen Änderung im elektrophoretischen Verhalten und anderer Sprühreaktion wieder Spaltprodukte entstehen, die nach Total-

hydrolyse einerseits Ala und andererseits gly und lys enthalten.

Deshalb wurde das Peptid unspezifisch mit Subtilisin hydrolysiert. Bei den angewandten Bedingungen (2 μ Mol Peptid, p_H 8,0, Enzym-Substrat-Verhältnis 10:100 (Gewichtsverhältnis), 2 h bei 37°) konnten zwei Spaltprodukte isoliert werden, die beide im Sprühtest Fry-negativ waren und ausser Ala keine weiteren Aminosäuren enthielten. Während das eine Produkt den gleichen R_F -Wert wie Ala hatte (Produkt S_2), wanderte das andere (S_3) wie Pro und enthielt intensitätsmässig wesentlich mehr Ala als Produkt S_2 , obwohl das letztere in etwas grösserer Ausbeute anfällt. Produkt S_3 muß daher die gesuchte Sequenz: Alanyl-Alanin enthalten. Neben weiteren Spaltprodukten (vergl. Abb.6) wurde wieder das Dipeptid:Gly-lys erhalten.

Eine Übersicht aller isolierten Spaltprodukte gibt Abb.6 wieder.

Stufenweiser Edman-Abbau.

Beweisend für die Alanyl-Alanyl-Sequenz im Pentapeptid verliefen ferner die Versuche, das Peptid stufenweise nach Edman²¹⁾ abzubauen. 1,8 μ Mol wurden der Reaktion mit Phenylisothiocyanat unterworfen, und nach Beendigung des 1. Abbauschrittes ein aliquoter Teil (1/4 der Menge) nach Totalhydrolyse quantitativ im Amino-Acid-Analyzer bestimmt. Da das Verhältnis von Ala zu Gly 1,14:1,00 betrug, ist als erste Aminosäure vom Pentapeptid Ala abgespalten worden.

Die restliche Menge des um eine Aminosäure verkürzten Peptides wurde erneut zum Edmanschen Abbau eingesetzt. Nach diesem 2. Schritt wurde die Hälfte der erhaltenen Lösung eingetrocknet und zur Totalhydrolyse und Analyse

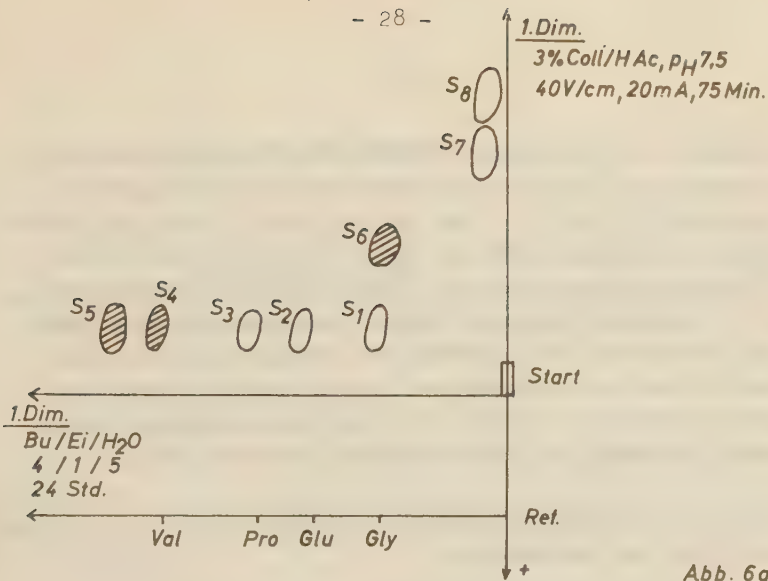


Abb. 6a

⊗ = Sprühtest auf Tryptophan positiv

Produkt Nr.	Try-Sprüh-Test	Aminosäure-zusammensetzung				
C ₁	pos.	Ala	Ala	Try		
C ₂	neg.				Gly	Lys
S ₈	neg.					Lys
S ₁	neg.				Gly	
S ₇	neg.				Gly	Lys
S ₄	pos.			Try		
S ₅	pos.		Ala	Try		
S ₂	neg.	Ala				
S ₃	neg.	Ala	Ala			
S ₆	pos.		Ala	Try	Gly	Lys
Sequenz :		Ala — Ala — Try — Gly — Lys				

Abb. 6b

Abb. 6 Partialhydrolyse des tryptischen Try-Penta-Peptides des Globins von krist. Hb A mit Subtilisin. 0,2 µmol Peptid, pH = 8,0, Enzym-Substrat-Verhältnis 10:100, 2 h bei 37° C. 6a: Trennung, der Partialpeptide, 6b: Analyse der Partialpeptide.

verwendet. Es wurde neben 0,436 μ Mol Gly kein Ala mehr nachgewiesen (auf die Bestimmung des Lys wurde jeweils verzichtet), sodaß bei den beiden ersten Stufen des Edman-Abbaues Ala abgespalten worden ist. Das Restpeptid des 2. Edmanschrittes, das bei UV-Bestrahlung fluoreszierte, aber vermutlich durch teilweise Zerstörung des Try (während der langen Cyclisierung des Carbaminsäurederivats des Peptids im sauren Milieu) mit Ehrlich's Reagens nur gelbe Farbreaktion zeigte, enthielt nach elektrophoretischer Reinigung und Totalhydrolyse nur noch Gly und Lys.

Aus allen Versuchen ergibt sich für Peptid XX/4/1 die gleiche Folge der Aminosäuren:

Ala-Ala-Try-Gly-Lys

Sequenzanalyse eines Phenylalanin-Hepta-Peptides.

(MG = 926,00)

Gewinnung des Peptids:

DNP-Methode: Das Peptid liess sich nach der DNP-Methode aus der Essigesterfraktion durch Extraktion mit Bicarbonatlösung und anschliessender Chromatographie im iso-Amylalkohol-System und Reinigung im Harnstoffpuffer in einheitlicher Form isolieren: Peptid c₂²⁴) (vergl. Abb. 1 und 2).

Die Bruttozusammensetzung des Peptides wurde nach der DNP-Methode von Levy quantitativ zu:

DNP Val-(Asp 1,96 , Val 1,11 , Pro 1,12 , Phe 0,26)-Lys 0,63 ermittelt (vergl. Abb. 7). Der Gehalt an Phe konnte bei Isolierung des Peptides nach der DNP-Methode nicht sicher erbracht werden, während im freien Peptid, das

Analysen des Phenylalanin-hepta-Peptids.

	Isolierung	Quantitative Bestimmungsmethode		Asp	Pro	Phe	Val	Lys	Amid-NH ₂
1.	DNP-Methode	DNP-Methode nach Levy nach Abtrennung des N-term. Val		1,96	1,12	0,26	1,11	0,63	—
2.	"	"		1,91	1,02	0,19	1,03	0,57	—
3.	Dowex 1 X 2-Verfahren	DNP-Methode nach Levy		2,10	0,87	1,05	2,01	0,67	—
4.	"	DNP-Methode nach Levy nach Abtrennung des N-term. Val		1,89	1,19	1,00	0,81	0,53	—
5.	"	Ninhydrin-Methode nach Stein u. Moore	μMol.	0,950	0,489	0,459	0,960	0,453	0,820
			R	2,03	1,04	0,98	2,05	0,97	(1,76)
			xx	x	x	x	x	x	x?

R = Reste / Molekül

x = 1 " / "

xx = 2 " / "

Abb. 7

nach dem säulenchromatographischen Verfahren dargestellt wurde, Phe einwandfrei nachzuweisen war (Vergl. Abb. 7).

Stein und Moore-Methode: Das Peptid lag im Gipfel HT₃ vor und wurde elektrophoretisch gewonnen (Vergl. Abb. 3).

Dowex 1 X2-Verfahren: Das Peptid ließ sich aus Fraktion XX/5a durch Verteilungschromatographie im Partridge-System vom zweiten in dieser Fraktion enthaltenen Peptid abtrennen. Durch Hochspannungselektrophorese in Py-Ac-Puffer, P_H 6,4 wurde es rein dargestellt.

Kettentrennung: Untersuchungen über die Zuordnung des Peptides zu einer der beiden Ketten wurden noch nicht durchgeführt.

Prüfung auf Reinheit:

Das Peptid wanderte elektrophoretisch einheitlich. Als N-terminale Aminosäure wurde Val erhalten, dessen DNP-Derivat sich im 2-D-Chromatogramm nach Levy ebenso verhielt. Die durchgeführten Aminosäureanalysen sind in Abb. 7 zusammengestellt. Sie ergaben das innerhalb der Messgenauigkeit ganzzahlige Verhältnis der im Peptid enthaltenen Aminosäuren:

Val 2,05 , Asp 2,03 , Pro 1,04 , Phe 0,98 , Lys 0,97

Sie zeigten ebenfalls, daß Val die N-terminale Aminosäure des Peptides ist, da nach Totalhydrolyse des Gesamtpeptids das Verhältnis von Val zu Asp wie 2,01:2,10 nach der Levy-Methode erhalten wurde, während nach der Überführung des Peptides in sein DNP-Derivat und nach Abtrennung seiner N-terminalen DNP-Aminosäure das Verhältnis beider Aminosäuren:

Val: Asp wie 0,81:1,89 gefunden wurde.

Partialhydrolysen:

Zunächst wurde untersucht, in welchem Teil des Moleküls sich das Phe befindet, da von seiner Lage im Peptid wesentlich dessen erfolgreiche enzymatische Zerlegung in zwei bis drei Bruchstücke abhängig ist.

Deshalb wurde eine unspezifische saure Hydrolyse mit 12 n Salzsäure durchgeführt (2 μ mol Peptid, 12 nHCl, 2 Tage bei 37°). Die Isolierung der Partialpeptide im Fingerprint-Verfahren und die in ihnen enthaltenen Aminosäuren gibt Abb.8 wieder. Wie die Analysen zeigen, wurden unter anderem Partialpeptid A₂, das Phe und Lys enthält, Produkt A₄, das sich aus Val, Pro und Asp zusammensetzt sowie Peptid A₅ mit Asp und Val isoliert. Durch Auffinden des Produkts A₂ erschien es wahrscheinlich, dass sich das im Peptid enthaltene Phe in zweitletzter Position vor dem C-terminalen Lys befindet, sodaß auf chymotryptische Zerlegung des Peptids verzichtet werden mußte.

Um Aussagen über die N-terminale Sequenz des Peptides machen zu können, wurde das Heptapeptid in sein DNP-Derivat überführt und dieses der Säurehydrolyse unterworfen (2-4 μ mol DNP-Peptid, 30 h bei 37°). Die Chromatographie der α -DNP-Peptide, die durch Extraktion mit Äther aus dem Ansatz isoliert wurden, im Toluolsystem nach Levy²⁷⁾ erbrachte nur ein Spaltprodukt: Das Partialpeptid B₁, dessen Analyse DNP Val und Asp ergab.

Zur Bestimmung der mittleren Sequenzen des Peptides und um möglichst N- und C-terminale Tripeptide zu erhalten, wurde das Heptapeptid enzymatisch mit Subtilisin

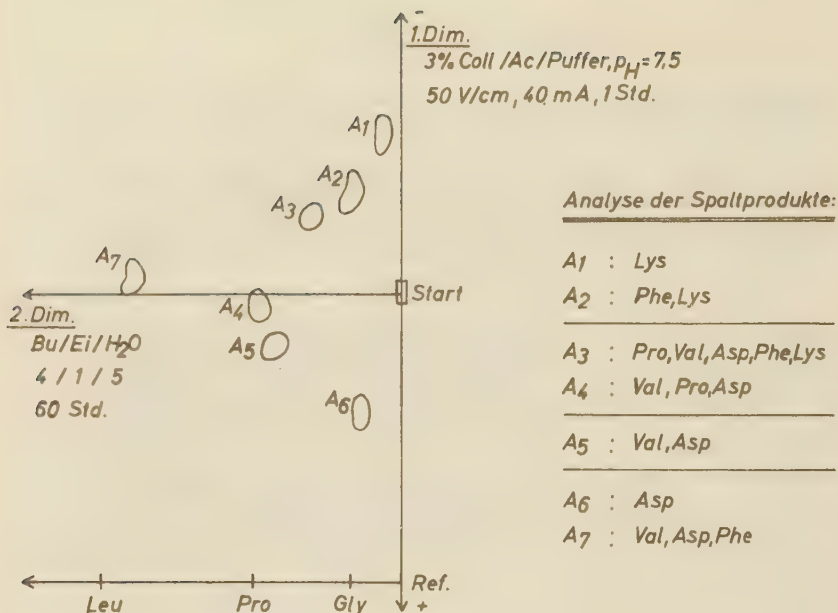


Abb.8 Trennung der Partialpeptide des tryptischen Hepta-Peptids aus Globin des krist. H Hb A nach Hydrolyse mit 12 normaler Salzsäure, 2 Tage bei 37°.

gespalten (optimale Bedingungen: 2 μ mol Peptid, p_H 8,0 Enzym-Substratverhältnis 6:100 (Gewichtsverhältnis), 1 h bei 30°). Die Isolierung der einzelnen Spaltprodukte im Fingerprint zeigt Abb.9. Neben einigen Partialpeptiden geringer Ausbeute erhielt man hauptsächlich ein Tripeptid, das Asp, Phe und Lys enthält (S₂) und ein weiteres Peptid, dessen Analyse Val, Asp und Pro ergab (S₈). Dieser Versuch machte es wahrscheinlich, dass einer der zwei Asp-Reste, die im Molekül enthalten sind, die drittletzte Stelle im Molekül besetzt.

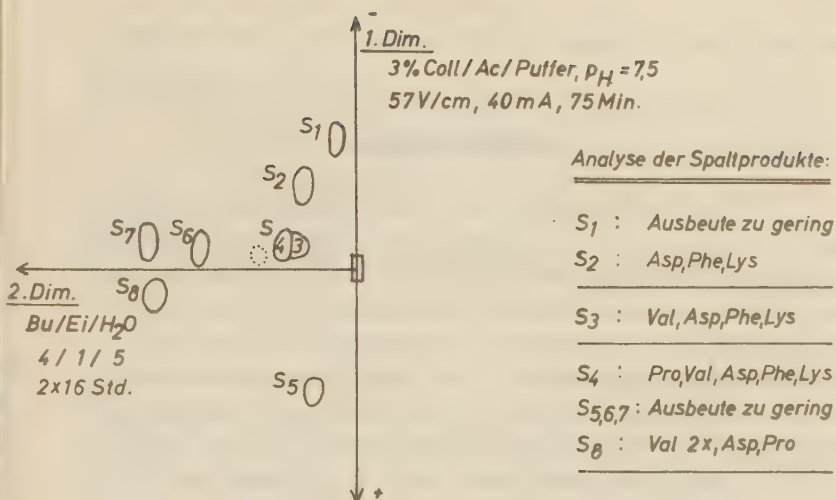


Abb.9 Trennung der Partialpeptide des tryptischen Phe-Hepta-Peptids aus Globin des krist.H Hb A nach enzymatischer Hydrolyse mit Subtilisin.

Versuchsbedingungen: 2 μ mol Peptid, p_H 8,0 , 30° , 1 h, Enzym-Substrat-Verhältnis 6:100 (Gewicht).

Ausserdem wurde das Peptid mit Pepsin hydrolysiert, wobei jedoch nur zwei Spaltstücke entstanden: freies lysin und ein Restpeptid P₁. das Phe enthält, vergl. Abb.11.

(optimale Bedingungen: 2 μ mol Peptid, gelöst in n/16 HCl p_H 1-2. Enzym-Substratverhältnis 6:100 (Gewichtsverhältnis), 3 h bei 37°).

Beweisführung:

Um die Folge der Aminosäuren im Phe-Peptid zu sichern, wurden die jeweils günstigen Partialpeptide wie beschrie-

ben isoliert und mittels Edman-Abbau, nach der DNP-Methode oder durch weitere Hydrolyse näher analysiert (vergl. Abb.10).

1. Die Sequenz am C-terminalen Ende des Peptides:

Zur Untersuchung wurde Spaltprodukt A₂, das Phe und Lys enthält, herangezogen. Nach einmaligem Edmanschen Abbau und Abtrennung des dabei gebildeten Hydantoins aus der N-terminalen Aminosäure konnte nur noch Lys nachgewiesen werden. Ausserdem wurde von Peptid S₂ die N-terminale Aminosäure geprüft: Das Peptid, das zunächst Asp, Phe und Lys enthielt, ergab nach einmaligem Edman-Abbau, Abtrennung des Hydantoins und Totalhydrolyse des restlichen Dipeptids nur Phe und Lys im 1-D-Chromatogramm. Damit liegt die Sequenz des C-terminalen Peptidendes in den Positionen 5 bis 7 zu : -Asp-Phe-Lys fest.

2. Die Sequenz am N-terminalen Ende:

Das nach saurer Hydrolyse erhaltene Peptid A₅, das neben Val nur Asp und auf Grund eines einmaligen Edman-Abbaus und Abtrennung des Hydantoins nur Asp enthielt, könnte dem N-terminalen Ende des Peptides entstammen. Da jedoch beide Aminosäuren zweimal im Peptid enthalten sind, ließ sich daraus kein sicherer Schluß ziehen. Auch Produkt S₈, das zunächst neben viel Val, Asp und Pro enthielt, und in dem nach einmaligen Edman-Abbau alle drei Aminosäuren wieder nachweisbar waren (nun in etwa gleichen Verhältnissen) war nur geeignet, einem der beiden Val-keste Position 1 zuzuweisen, was bereits oben bewiesen wurde. Der Versuch zeigte, daß die Hydrolyse mit Subtilisin unter den gewählten Bedingungen hauptsächlich zwischen Position 5 und 4 erfolgt. Beide Val-

Zusammenstellung der isolierten Spaltprodukte des Phenylalanin-hepta-Peptids.

Partial-hydrolyse:	Peptid Nr.:	Analyse:						
HCl	A ₁							Lys
HCl	A ₂						^o Phe	Lys
Subtilisin	S ₂					^o Asp	Phe	Lys
Subtilisin	S ₃				Val	Asp	Phe	Lys
HCl	A ₇				Val	Asp	Phe	
HCl	A ₃			^{o,*} Pro	Val	Asp	Phe	Lys
Subtilisin	S ₄			Pro	Val	Asp	Phe	Lys
HCl	A ₄			^{o,*} Pro	Val	Asp		
Subtilisin	S ₈	^o Val	Asp	Pro	Val			
	S ₈₍₁₎	Val	Asp					
	S ₈₍₃₎			*Pro	Val			
HCl	A _{5, B₁}	^{o,*} Val	Asp					
Sequenz:		Val — Asp — Pro — Val — Asp — Phe — Lys						

^o = Edman-Abbau

* = DNP-Umsetzung

Abb. 10

heste befinden sich daher im vorderen Partialpeptid (S_8), während die zwei im Molekül enthaltenen Asp-Reste sich auf beide Bruchstücke verteilen.

Dagegen zeigte Produkt b_1 , das nach saurer Hydrolyse des DNP-Peptids isoliert wurde, daß die N-terminale Sequenz des Hepta-Peptids Val-Asp ... lauten muß. Die gleiche Sequenz konnte auch bei nochmaliger Spaltung von Partialpeptid S_8 mit 12 n Salzsäure (1 μ mol Peptid S_8 , 12 n HCl, 30 h bei 37°) isoliert werden: S_8 (1).

3. Die mittlere Sequenz des Peptides.

Nach obigen Versuchen ist die Sequenz am N- und C-terminalen Ende zu: Val-Asp-Asp-Phe-Lys festgelegt. Wie aus den Analysen hervorgeht, sind im Peptid ausserdem nur noch ein Pro- und ein Val-Rest enthalten. Für die Lage innerhalb des Hepta-Peptids ergaben sich zwei Möglichkeiten:

- a) Position 3: Pro, Position 4: Val
- b) Umgekehrt.

Für Möglichkeit a) sprach die Isolierung des Partialpeptids A_3 : Pro, Val, Phe, Lys, das nach einmaligem Edman-Abbau oder auch nach Überführung ins DNP-Derivat nur noch folgende Aminosäuren nach der Totalhydrolyse des Restpeptids in wasserlöslicher Form enthielt: Val, Asp, Phe, Lys.

Ebenso konnte aus Peptid A_4 diese Möglichkeit wahrscheinlich gemacht werden. Es enthielt Pro, Val und Asp in gleichen Mengen und mittels DNP-Methode oder Edman-Abbau wurde indirekt Pro als seine N-terminale Aminosäure durch die erhaltenen restlichen wasserlöslichen Aminosäuren Val und Asp wahrscheinlich gemacht. Danach mußte dem enthaltenen Asp die Position 5 zukommen und die Sequenz dieses

Partialpeptids Pro-Val-Asp (Position 3-5) lauten.

Die mögliche Sequenz a) könnte dagegen durch Versuche, die am Pepsin-Peptid P_1 mit Carboxypeptidase durchgeführt wurden, in Frage gestellt sein. Durch enzymatische Weiterbehandlung mit diesem Ferment bildete sich freies Phe und das Restpeptid CR (vergl. Abb. 10 und 11), das Val, Asp und Pro aber kein Phe und Lys enthielt. Bei einer Sequenz entsprechend Möglichkeit a) sollte neben viel Phe auch etwas Asp mit Carboxypeptidase abspaltbar sein, während bei unmittelbarer Nachbarschaft des Pro-Restes die Asp-Abspaltung eher verhindert würde. Da keine Asp nachgewiesen werden konnte, wurde Carboxypeptidase-Peptid C_R der Hydrolyse mit Subtilisin unterworfen. Das Peptid wurde jedoch unangegriffen ohne Abspaltung von C-terminalen Asp oder Val-Asp zurückgewonnen. Da über das Verhalten von Subtilisin sich bisher noch keine allgemeingültigen Regeln seiner Spezifität abzeichnen (vergl. Kapitel über die Spezifität), liessen sich aus diesen Versuchen keine Schlüsse über die richtige mittlere Sequenz ziehen.

Zur näheren Sequenzbestimmung wurde Subtilisin-Peptid S_8 herangezogen. Wie oben gezeigt wurde, enthält dieses Peptid die mittlere Sequenz. Durch Einsatz von 4μ Mol Heptapeptid und Subtilisinspaltung konnte es in ausreichender Menge isoliert werden. Durch Incubation mit Salzsäure wurde es entsprechend der säure-labilen Bindung des ganzen Peptides zwischen Position 2 und 3 (Vergl. Abb. 11) - wie oben erwähnt weitergespalten. Das dabei erhaltene Peptidgemisch wurde durch 1-D-Chromatographie im Partridge-System getrennt. Es wurden drei Spaltprodukte isoliert: Das Dipeptid Val-Asp, ein Tripeptid mit den Aminosäuren Val, Asp und Pro (S_8 (2)) und ein Dipeptid, das Pro und Val enthielt (S_8 (3)). Dieses Peptid

Übersicht über die am Phenylalanin-hepta-Peptid durchgeführten
Partialhydrolysen.

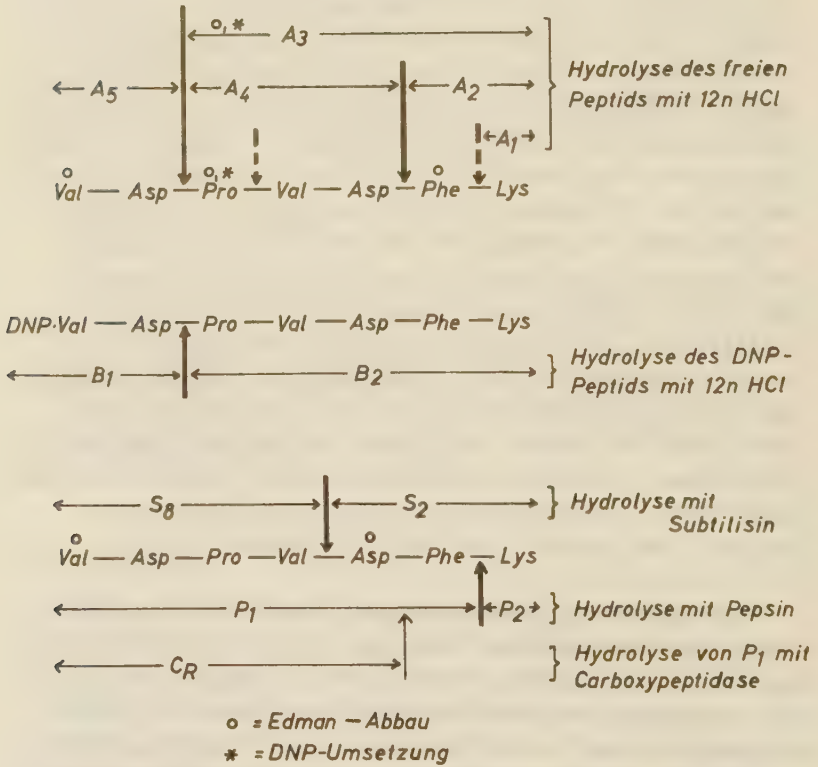


Abb. 11

gab mit Ninhydrin nicht die übliche Anfärbung, sondern färbte sich wie Pro gelb. Seine Sequenz wurde durch Überführung ins DNP-Derivat durch Bestimmung der optischen Dichte (es hat ein Extinktionsmaximum bei $380\text{ m}\mu$ wie DNP-Prolin) und 1-D-Chromatographie der wasserlöslichen Aminosäure (Val) zu Pro-Val entsprechend Möglichkeit a) gesichert.

Damit ergibt sich die Sequenz des untersuchten Heptapeptides XX/5a/1:

1	2	3	4	5	6	7
<u>Val-Asp-Pro-Val-Asp-Phe-Lys</u>						

Eine Übersicht der am Heptapeptid durchgeführten Partialhydrolysen gibt Abb.11 wieder.

Säureamidverteilung des Peptides.

Auf Grund der durchgeführten Analysen ist es wahrscheinlich, daß einer der beiden Asp-Reste als β -Säureamid vorliegt. Aus dem elektrophoretischen Verhalten der erhaltenen Partialpeptide (Vergl. Abb.8 und 9) muß geschlossen werden, daß Position 2 durch freie Asparaginsäure und Position 5 durch AspNH_2 besetzt ist. Doch sind keine abschliessenden Versuche durchgeführt worden.

Sequenzstudien an einem Hexadeca-Peptid.

(MG = 1939,09)

Gewinnung des Peptids:

DNP-Methode: Das Peptid wurde aus der HCl-Fraktion erhalten und auf diesem Wege nicht in reiner Form dargestellt. 25)

Dowex 1 X 2-Verfahren: Das aus Fraktion XX/8 isolierte Peptid lag bereits einheitlich vor, wie aus dem chromatographischen und pherographischen Verhalten hervorging. Zur Reinigung wurde es in Py-Ac-Puffer, p_H 6,3 pherographiert, wobei es kaum schneller als die neutralen Aminosäuren kathodisch wanderte.

Kettentrennung: Das Peptid konnte der β -Kette zugewiesen werden.

Prüfung der Reinheit:

Pherographisch wanderte das Peptid in Coll-Ac-Puffer, p_H 7,6 einheitlich. Ebenso verhielt es sich bei Verteilungschromatographie im Partridge-System.

Seine N-terminale Aminosäure wanderte ebenfalls im 2-D-Chromatogramm nach Levy als DNP-Derivat einheitlich. Es wurde DHP-Valin ermittelt.

Die im Peptid enthaltenen Aminosäuren wurden quantitativ nach der Stein und Moore-Methode im Amino-Acid-Analyzer und als DNP-Derivate nach der Levy-Methode ermittelt.

(Vergl. Abb. 12):

Asp 3,02 , Ser 1,09 , Gly 2,10 , Ala 2,12 , Val 0,96 ,
Leu 4,05 , Phe 1,01 , Lys 0,92 , His 1,04.

Die quantitativen Analysen zeigen, daß das Peptid zur Untersuchung in reiner Form ^{vor-}gelegen hat.

Partialhydrolysen:

Während das oben beschriebene Phe-Peptid wirksam durch unspezifische Hydrolyse mit Säure oder durch Subtilisin-spaltung in kleine Bruchstücke zur Sequenzanalyse zerlegt werden konnte, schienen diese Spaltungsarten infolge der vielen Asp- und leu-keste hier ungeeignet zu sein.

Quantitative Analysen des Hexa-deca-Peptids.

	Peptid xx / 8			Partialpeptide						
				C ₃		C ₂		C ₁		
	B	A	R	A	R	A	R	A	R	
Asp	3,09	3,02	xxx			0,97	x	1,98	xx	
Ser	0,80	1,09	x			0,74	x			
Gly	2,08	2,10	xx	1,01	x	1,27	x			
Ala	2,01	2,12	xx	1,01	x	1,00	x			
Val	1,09	0,96	x	1,00	x					
Leu	3,82	4,05	xxxx	0,92	x	2,00	xx	1,03	x	
Phe	1,19	1,01	x	1,02	x					
Lys	0,64	0,92	x					1,0	x	
His		1,04	x			1,22	x			
Säure NH ₂		(1,72)	1-2							
Summe:				16	5	7	4	=16		

A = Quantitative Bestimmung nach Stein und Moore im Analyzer

B = Quantitative Bestimmung nach der DNP-Methode (Levy)

R = Reste / Molekül

x = 1 Reste / Molekül

xx = 2 " / "

xxx = 3 " / "

xxxx = 4 " / "

Abb.12

Ein für die Sequenzanalyse geeigneter Abbau des Gesamtmoleküls müsste möglichst zwei bis drei grössere definierte und reproduzierbare Spaltstücke ergeben. Tatsächlich erhielt man bei Subtilisinhydrolyse des Moleküls schon nach 1-stündiger Einwirkungsdauer des Fermentes bei 30° über zehn verschiedene Partialpeptide, die mühsam zu trennen waren und selbst bei genauen quantitativen Analysen dem Gesamtpeptid nur schwer zugeordnet werden können. Auch die saure Hydrolyse des Peptids, die zur Erleichterung der Zuordnung der einzelnen Partialpeptide am DNP-Derivat durchgeführt wurde, lieferte etwa zwölf Produkte, die bislang nur zur Ermittlung der Sequenzen des C- und N-terminalen Endes herangezogen wurden. Abgesehen von der schwierigen Reindarstellung der nach diesen Verfahren hergestellten Partialpeptide waren diese Spaltungen im vorliegenden Falle besonders ungünstig, weil mehrere Asp- und Leu-Reste am C-terminalen Ende des Peptids angehäuft sind, sodaß fast alle C-terminalen Peptidbindungen der Hydrolyse unterworfen waren. Daher wurden nicht alle gewonnenen Produkte näher analysiert, zumal sie meist in sehr geringen Mengen anfielen. Analysen lassen sich nur bei Verwendung grösserer Peptidmengen und nach säulenchromatographischer Trennung der Partialpeptide durchführen.

Besonders geeignet zur enzymatischen Hydrolyse des Hexadeca-Peptids erwies sich die Spaltung mit Chymotrypsin. Es bildeten sich definierte Spaltprodukte, die zur Zerlegung des Gesamtpeptids in drei Teilbereiche besonders deshalb vorteilhaft erschienen, weil alle mehrmals im Peptid enthaltenen Aminosäuren sich günstig auf die drei Spaltprodukte verteilten. Unter optimalen Bedingungen wurde das Molekül bei pH 7,8-8,0 4 h bei 37° mit Chymotrypsin gespalten. (Enzym-Substratverhältnis

2,5-3 : 100, Gewichtsverhältnis). Die Trennung des erhaltenen Peptidgemisches im Fingerprint erwies sich als ungünstig. Die gebildeten Bruchstücke wurden elektrophoretisch nur sehr langsam auseinander gezogen, wobei Produkte gleicher qualitativer Aminosäurezusammensetzung resultierten. In der 2. Dimension im Partridge-System wanderte nur eine Komponente mit einem höheren R_f -Wert als Leu schnell, die anderen Spaltprodukte infolge der vielen Asp-, Ser-, Gly- und His-Reste dagegen sehr langsam, sodaß nur unreine Produkte isoliert werden konnten.

Die Darstellung reiner chymotryptischer Partialpeptide gelang durch Ausarbeitung optimaler Spaltungs-Bedingungen, unter denen im wesentlichen nur zwei Peptidbindungen des Moleküls hydrolysiert wurden. Die gebildeten drei Partialpeptide wurden durch 1-D-Chromatographie in einem modifizierten Partridge-System (B.W 3:1 : 1) getrennt. (Vergl. Abb.13) Während Produkt C_1 und C_3 wie üblich ninhydrinpositiv waren, färbte sich das 2.Peptid gelb-braun und war UV-aktiv. Das deutete auf N-terminales His in diesem Partialpeptid, das im Sprühtest entsprechend His-positiv reagierte, während die beiden anderen Produkte keine Reaktion auf His zeigten. Die chymotryptischen Partialpeptide wurden vom Papier mit 4%iger Essigsäure eluiert, in Py-Ac-puffern, pH 3,6 und 6,3 elektrophoretisch gereinigt und auf Einheitlichkeit nach der Stein und Moore-Methode im Amino-Acid-Analyzer geprüft. Abb.12 zeigt die isolierten Produkte:

Partialpeptid:

C_3 : Val 1,00 , Leu 0,92 , Gly 1,01 , Ala 1,01 , Phe 1,02

C_2 : His 1,22 , Leu 2,00 , Ala 1,00 , Gly 1,27 , Ser 0,74
Asp 0,97

C_1 : Asp 1,98 , Leu 1,03 , Lys 1,0 .

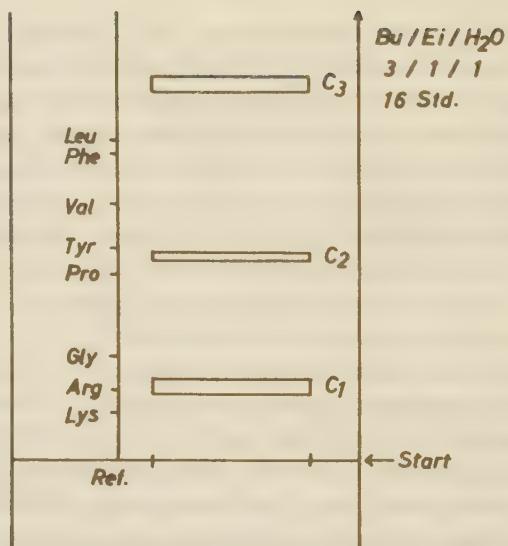


Abb.13 Verteilungschromatographie der chymotryptischen Partialpeptide des tryptischen Hexadeca-Peptids des Globins von krist. H Hb A.

Lösungsmittel: BEW (3:1:1) 1-dim., absteigend,

Laufzeit 16 h.

Chymotrypsin-Peptid C₁, C₂ und C₃.

Die Summe der in diesen Produkten enthaltenen Aminosäuren ergab die aus der Gesamtanalyse zu fordernden 16 Aminosäurereste, sodaß mit Peptid C₁₋₃ die Hauptprodukte der chymotryptischen Spaltung des Hexadecapeptids erfasst worden sind.

Die Sequenz des N-terminalen Bruchstücks.

Zur Festlegung der N-terminalen Sequenz des Peptides wurde es nach Überführung ins DNP-Derivat nach Levy mit 12 n Salzsäure 30 h bei 37° partiell hydrolysiert. Die N-terminalen α -DNP-Peptide wurden mit Äther extrahiert und nach 1-D-Chromatographie im Levy-System zwei DNP-Peptide isoliert, die folgende Aminosäuren nach Totalhydrolyse enthalten:

Peptid B₁ : DNP-Val, Leu .

Peptid B₂ : DNP-Val, Leu, Gly.

Die Versuche konnten reproduziert werden, sodaß Partialpeptid C₃ des chymotryptischen Abbaues das N-terminale Spaltstück des Hexadecapeptids darstellt, weil in ihm allein alle drei Aminosäuren gemeinsam enthalten sind.

Die wasserlöslichen Partialpeptide der sauren Hydrolyse wurden elektrophoretisch und chromatographisch voneinander getrennt. Dabei wurde neben mehreren grösseren Peptiden, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung erst quantitativ bestimmt werden müssen, ein Dipeptid mit Ala und Phe (B₄) isoliert (Vergl. Abb. 14).

Auch bei Spaltung des Gesamtmoleküls mit Subtilisin wurde das gleiche Pentapeptid wie nach chymotryptischer Spaltung (S₂ = C₃) gewonnen (Versuchsbedingungen: 2 μ Mol Peptid p. 7,8, Enzym-Substratverhältnis 3:100, (Gewichtsverhältnis) 1 h bei 37°). Ein weiteres Produkt mit Gly, Ala und Phe (S₁) konnte in geringen Ausbeuten nach-

gewiesen werden.

Da Chymotrypsin im allgemeinen Peptidbindungen an der C-terminalen Peptidbindung der aromatischen Aminosäuren angreift, müsste Spaltprodukt C_3 bzw. S_2 Phe als C-terminale Aminosäure enthalten. Das wurde durch Versuche mit Carboxypeptidase an Peptid C_3 geprüft:

Dazu wurde 1 μ mol des Partialpeptids bei p_H 8,0 mit 50% Ferment bei 37° behandelt. Bereits nach einstündiger Einwirkungsdauer war jedoch neben Phe (C_3 (2)) auch Ala (C_3 (1)) in Freiheit gesetzt worden. Ließ man das Ferment bei 30° zur Einwirkung kommen, wurden ebenfalls beide Aminosäuren nachgewiesen, obwohl schon nach 25 und 10 Minuten dem Ansatz Proben entnommen wurden. Bei diesem Versuch wurde das restliche Tripeptid: Val, Leu, Gly (C_3 (3)) isoliert, sodaß Spaltprodukt B_2 enzymatisch reproduziert werden konnte.

Da die geschilderten Versuche nicht eindeutig die Stellung des Phe am C-terminalen Ende des Pentapeptids C_3 sichern konnten, wurde das Peptid zusätzlich der Hydrazinolyse²²⁾ unterworfen. Dazu wurde Peptid C_3 mit wasserfreiem Hydrazin 4 h bei 100° incubiert. Nach Abtrennung der mit iso-Valerylaldehyd gebildeten Hydrazone mit Äther wurde die C-terminale freie Aminosäure in Phenol-m-Kresol-Boratpuffer, p_H 8,3 chromatographiert. Es konnte nur Phe allein nachgewiesen werden.

Aus der Isolierung des Dipeptids DNP-Val-Leu (B_1), des Tripeptids DNP-Val-Leu-Gly (B_2), des Dipeptids Ala-Phe (B_4) und des Tripeptids Gly-Ala-Phe (S_1) sowie der Festlegung von Phenylalanin als C-terminale Aminosäure des Pentapeptids C_3 ergibt sich dessen Sequenz und somit die N-terminale Folge der Aminosäuren des Hexadeca-

Peptids zu:

1 2 3 4 5
Val-Leu-Gly-Ala-Phe.....

Die Sequenz des C-terminalen Peptidendes.

Wegen seines Lys-Gehaltes ist Chymotrypsin-Peptid C_1 das C-terminale Bruchstück des Hexadeca-Peptids. Das ließ sich durch Isolierung C-terminaler ϵ -DNP-Lysin-Peptide, die nach Partialhydrolyse des DNP-Hexadeca-Peptids gebildet werden müssen, erhärten.

Bei saurer Partialhydrolyse (Bedingungen wie oben) und Extraktion der ϵ -DNP-Lysin-Peptide mit Essigester und Trennung im 2-D-Chromatogramm wurde ein Tripeptid gewonnen, das Asp, Leu und ϵ -DNP-Lys (B_6) enthält. Das gleiche Peptid wurde isoliert, wenn Chymotrypsin-Peptid C_1 nach Levy ins DNP-Derivat überführt und anschliessend mit 12 n Salzsäure partiell hydrolysiert wurde.

Die N-terminale Aminosäure von Peptid C_1 , das ausser den drei erwähnten Aminosäuren noch einen 2.Asp-Rest enthält (Vergl. Abb. 12), kann also nur Asp sein. Dieses wurde durch 2-D-Chromatographie der N-terminalen DNP-Aminosäure von C_1 bestätigt. Ausserdem wurde durch einmaligen Edmansen'schen Abbau dieses Partialpeptids das Verhältnis von Asp zu Leu wie 1,02:1,00 quantitativ bestimmt: ein Asp-Rest wurde abgespalten und liegt daher N-terminal vor.

Zur Festlegung der 2. und 3. Position im endständigen Tetrapeptid wurden saure Partialhydrolysen unter anderen Bedingungen wiederholt, doch immer das gleiche Partial-Tripeptid B_6 isoliert. Nur in geringer Ausbeute konnte ein Dipeptid mit Leu und ϵ -NP-Lysin erhalten werden. Daher wurde Peptid C_1 einem stufenweisen Edman'schen Abbau unterworfen. Nach dem 2. Edman-Schritt betrug das Verhältnis Asp zu Leu nur noch 0,50:1,00. Da Leu durch Edman Abbau wesentlich leichter als Asp abgespalten würde, muß

auch die 2. Position in Peptid C₁ durch Asp besetzt sein. Das nach zweimaligem Edman'schen Abbau gebildete Rest-Dipeptid wurde elektrophoretisch nachgereinigt. Nach seiner Totalhydrolyse wurden im Chromatogramm neben Spuren von Asp nur Leu und Lys nachgewiesen.

Daraus ergibt sich die Sequenz des Chymotrypsin-Peptids C₁ und somit die C-terminale Aminosäurefolge des Hexadeca-Peptids:

13 14 15 16
Asp-Asp-leu-Lys

Die Sequenz des Mittelstücks.

Die Sequenzanalysen des mittleren Teilbereichs des Hexadeca-Peptids sind noch nicht abgeschlossen. Die Bestimmung der Folge der Aminosäuren wird durch Analyse des Chymotrypsin-Peptids C₂ vorgenommen und zur Erhärtung der Gesamtstruktur werden Pepsin- und Subtilisin-Hydrolysen herangezogen.

Peptid C₂ lässt sich durch unspezifische Hydrolyse mit Salzsäure (2 μ mol Peptid, 20 h bei 37°) in drei Teilbereiche zerlegen, die im Fingerprintverfahren aufgetrennt werden können. C₂ wird dabei in ein Dipeptid mit His und Leu, dessen N-terminales Histidin durch Edman-Abbau gestützt wird, ein Tripeptid (Gly, Ser, Asp), dessen N-terminale Aminosäure Ser sein dürfte, sowie das Dipeptid (Ala, Leu) zerlegt. Das letztere muß die C-terminale Sequenz des Mittelstücks C₂ darstellen, da nach Carboxypeptidasebehandlung dieses chymotryptischen Partialpeptids neben Spuren von Histidin Ala und Leu nachgewiesen werden können.

Zur Festlegung der Sequenz wird zusätzlich der stufenweise Abbau nach Edman herangezogen.

Verteilung der Säureamidgruppen.

Auf Grund der durchgeführten quantitativen Analysen sind im Hexadeca-Peptid wahrscheinlich zwei Säureamidgruppen enthalten, danach würden zwei der drei im Molekül enthaltenen Asp-Reste als β -Amid vorliegen. Das wird gestützt durch das elektrophoretische Verhalten des Gesamtpeptids und der Partialpeptide, die isoliert werden konnten. Danach würde die im mittleren Teilbereich des Peptids enthaltene Asp in freier Form vorliegen, während die beiden in Position 13 und 14 befindlichen Reste AspNH_2 sein dürften.

Zusammenfassung:

Die Aminosäurefolge des Hexadecapeptides XX/8 wurde in den ersten fünf Positionen des Peptides festgelegt und die Sequenz des C-terminalen Tetrapeptides ermittelt. Die Sequenzanalyse der sieben Aminosäuren des mittleren Teilbereiches des Peptides wurde noch nicht durchgeführt. Die quantitative Analyse ergab, daß die Positionen 6 bis 12 durch zwei Leu-, einen Gly-, Ser-, Ala- und Asp-Rest besetzt werden.

Die Teilformel lautet daher:

Val-Leu-Gly-Ala-Phe- (His, Leu, Ser, Gly, Asp,
Ala, Leu) - Asp-Asp-Leu-Lys.

C. Der Angriff der proteolytischen Fermente auf die untersuchten tryptischen Globinpeptide.

Die durchgeführten Untersuchungen dienten in erster Linie der Strukturbestimmung der einzelnen Peptide. Deshalb wurden die für ein genaueres Studium der Enzymaktivitäten notwendigen Versuche nicht vollständig durchgeführt. Vor allem die in geringen Ausbeuten anfallenden Spaltprodukte wurden meist vernachlässigt und der Reinheitsgrad der Fermente nicht näher getestet.

Dennoch ergaben sich beim Studium der Globinpeptide ähnliche Befunde, wie sie sich in den letzten Jahren bei Untersuchungen an anderen Peptiden und Proteinen abgezeichnet haben. Die von Bergmann und Mitarbeitern³⁰⁾ an synthetischen Substraten abgeleiteten Enzymspezifitäten gelten im allgemeinen bei Anwendung auf grössere Peptide und Proteine nicht mehr streng.

Nur Trypsin greift spezifisch am C-terminalen Ende von Lys und Arg an. So wurde z.B. die Gly-Kette des Insulins, die kein Lys und Arg enthält, unverändert bei tryptischer Verdauung zurückgewonnen und auch bei Spaltung des Globins mit Trypsin ließen sich neben den zwei als C-terminale Sequenzen der beiden Ketten in Frage kommenden Peptide nur Lys- und Arg-Peptide nachweisen.

Dagegen mussten die Vorstellungen über die Wirkung des Chymotrypsins bei grösseren Peptidsubstraten erweitert werden. Es greift hauptsächlich am C-terminalen Ende der aromatischen Aminosäuren (Tyr, Phe, Try) an, doch werden auch Met-enthaltende Peptidbindungen an ihrem C-terminalen Ende hydrolysiert und bei den Untersuchungen an Insulin, Ribonuclease, Lysozym und anderen zeigte sich

daß auch andere Bindungstypen gespalten werden können (z.B. beim α -ACTH : Leu-Glu, Val-Lys, GluNH₂-Ala, beim Insulin: A-Kette: CySO₃H-Ser , B-Kette: Leu-Val).

Die Zahl der vom Enzym angegriffenen Peptidbindungen hängt auch von der Dauer der Spaltung ab, was für die untersuchten Globin-Peptide zutrifft. Um wenige, definierte Stellen des Peptidverbandes zu hydrolysieren, wurde deshalb die Zeit der Fermenteinwirkung möglichst kurz gewählt (etwa 4 h). Aber auch so wurden nicht nur "streng-spezifische" Bindungen gelöst: Das Hexadeca-Peptid wurde am C-terminalen Ende von Phe und einer nicht aromatischen Aminosäure (wahrscheinlich am Leu) gespalten.

Pepsin hat einen bedeutend breiteren Spezifitätsbereich als ursprünglich angenommen wurde. Seine Wirksamkeit ist nicht nur auf die N-terminale Peptidbindung aromatischer Aminosäuren beschränkt, sondern spaltet Bindungen, die diese Aminosäuren einschliessen. So wurden bei der Phe-Kette des Insulins beide Seiten der Tyr-Reste angegriffen und beim β -MSH eine Phe-Arg-Bindung hydrolysiert. Entsprechend wurde beim tryptischen Phe-Hepta-Peptid aus Globin die Phe-Lys-Bindung peptisch gespalten. Auch aus Ribonuclease sind C-terminale Phe-, Val- und His-Peptide isoliert worden.

Deshalb erscheint es günstiger, grössere tryptische Globinpeptide, die aromatische Reste enthalten, durch kurze Einwirkungszeit mit Chymotrypsin in wenige Teilbereiche zu zerlegen, die zur Sequenzanalyse herangezogen werden können. Dagegen wird Pepsin bei Peptiden mit mehreren Glu-Resten vorzuziehen sein.

Während Trypsin und in etwas weiteren Grenzen auch Chymotrypsin und Pepsin eine recht definierte "Reste-Spezifität" aufweisen, scheint Subtilisin in seiner Wir-

kung sehr von Kettenlänge und Konfiguration des Substrates beeinflusst zu werden, obwohl bei dem jeweiligen Peptid eine begrenzte Zahl an Bindungen (jeweils die gleichen) an Stellen, die für den Angriff besonders begünstigt sind, schneller angegriffen werden als die übrigen. Harris³¹⁾ stellte auf Grund seiner Untersuchungen an MSH und den Erfahrungen, die man an anderen Substraten gemacht hat, einige Regeln für den Angriff des Fermentes auf:

1. am C-terminalen Ende der aromatischen
2. am C-terminalen Ende des GluNH₂ und Met,
3. am N-terminalen Ende der basischen Aminosäuren,
4. am N-terminalen Ende der sauren Aminosäuren.

Besonders begünstigt sind daher Bindungen, die zwei der vier Kategorien erfüllen (z.B. Tyr-lys).

Subtilisin ist weniger gut geeignet um Peptide zu spalten, die viele kurze neutrale und keine aromatischen Aminosäurereste enthalten. Es ergänzt daher nicht die Wirkungsbereiche der übrigen Fermente, sondern vereinigt sie in gewissem Masse in sich. Seine Aktivität wird besonders durch Nachbarschaft von Prolin gehemmt, wie auch die Untersuchungen am tryptischen Phe-Peptid des Globins zeigten. Bei diesem Peptid blieb daher nur die Bindung zwischen Position 5 und 4 (Val-Asp) zur Spaltung übrig, wo das Ferment weitgehend spezifisch angreift.

Aus der C-terminalen Sequenz des Hexadeca-Peptids aus Globin wurde bei Subtilisin-spaltung nicht das C-terminale Dipeptid Leu-lys gebildet, wie bei unspezifischer enzymatischer Hydrolyse zumindest in geringem Umfange zu erwarten wäre, sondern die Spaltung setzte am N-terminalen Ende des Asp-Restes ein.

Daß Subtilisin definierte Stellen des Peptidverbandes spaltet, zeigten auch Untersuchungen, die an einem Arginyl-peptid aus Globin durchgeführt wurden. Während von Ingram³²⁾ die Sequenz an diesem Peptid zunächst zu Val-Asp-Glu-Val..

festgelegt worden war, wurde aus dem DNP-Peptid durch Subtilisinspaltung oder durch saure Hydrolyse ein N-terminales Tripeptid: DNPVal-Asp-Val isoliert, das auch unter energiereicheren Bedingungen spezifisch erhalten wurde. Das Auftreten dieses DNP-Tripeptids wurde durch Abspaltung des C-terminalen Val-restes mit Carboxypeptidase und Isolierung des restlichen Dipeptids: DNPVal-Asp gesichert.

Bei der Einwirkung von Carboxypeptidase, das C-terminale Aminosäuren dann abspaltet, wenn deren Carboxylgruppen in freier Form vorliegen, ist die große Affinität zu aromatischen und langkettigen Resten bekannt. Dabei macht sich die Anwesenheit basischer Reste und Prolingruppen störend bemerkbar, wenn sie sich in Nachbarschaft obiger Aminosäuren befinden. Auch die Erfahrungen, die am Phe-Peptid aus Globin gemacht wurden, zeigen den hemmenden Einfluss des Prolins.

Obwohl man noch keine Aussagen über die Gesetzmässigkeiten der Verteilung und Folge der Aminosäuren im Peptidverband der Proteine machen kann, sind bei der Untersuchung der wenigen bisher bekannten Polypeptide und Proteine immer wieder gleiche Beobachtungen gemacht worden, die auch beim Globin zuzutreffen scheinen, obgleich es wie alle anderen Proteine seinen eigenen Charakter im Aufbau besitzt.

1. Augenfällig sind häufig vorkommende Doppelsequenzen z.B. Insulin: Cys-Cys, Glu-Glu (Gly-Kette) Phe-Phe (B-Kette, α -ACTH : Lys-Lys, MSH: Pro-Pro, Ribonuclease: Ala-Ala-Ala.)

Auch bei den wenigen untersuchten Globinpeptiden finden sich Beispiele: Ala-Ala (Try-Peptid), Asp-Asp (Hexadeca-

Peptid).

2. Oft sind Wiederholungen von Dissequenzen innerhalb des gleichen Peptidverbandes beobachtet worden, so beim Insulin: Cys-Gly, Ileu-Val, was auch im Falle des Phe-Peptids aus Globin (Val-Asp) zutrifft.

3. Vielfach sind aromatische mit basischen Aminosäuren vergesellschaftet (z.B. α und β MSH, α ACTH) oder viele aromatische angehäuft. Dafür lassen sich auch die tryptischen Globinpeptide heranziehen: Die Phe-His-Bindung im Hexadeca-Peptid und die Phe- Lys- Bindung im Phe-Peptid.

Experimenteller Teil

A : Allgemeine Methodik.

I. Reinigungsverfahren für die Peptide:

1. Die Elektrophoresen werden auf Schleicher-Schüll-Papier 2034 b unter Toluolkühlung bei einer Spannung von 40-100 V/cm ausgeführt. Die Substanz wird in Puffer gelöst und auf der Startlinie aufgebracht. Der Papierstreifen wird anschliessend durch Besprühen mit der Pufferlösung befeuchtet.

Verwendete Pufferlösungen:

- a) Py-Ac-Puffer, p_H 6,3 : 5% Pyridin, 0,2% Eisessig
- b) Py-Ac-Puffer, p_H 3,6 : 3% Eisessig, 0,4% Pyridin
- c) Coll-Ac-Puffer, p_H 7,5 : 3% 2,4,6-Collidin, 2,5% Eisessig. Der p_H -Wert der Lösung wurde mit Eisessig eingestellt.

für DNP-Peptide: Harnstoff-Puffer, p_H 9,0 : 240 g Harnstoff (reinst), 100 ml Pyridin, 8 ml Triäthylamin, 2 ml 98% Ameisensäure (p.a.), mit H_2O aufgefüllt auf 1 lt.

2. Zur Verteilungschromatographie am Papier werden folgende Systeme verwandt:

- a) Partridge-System: Butanol/ Eisessig/ Wasser, 4:1:5 = BrW.
- b) modifiziertes Partridge-System: n Butanol/ Eisessig/ Wasser, 3:1:1 = mod. BrW.
- c) Pyridinsysteme: 1) n-Butanol/ Pyridin/ Eisessig/ Wasser: 30 : 20 : 6 : 24
2) iso-Amylalkohol/Pyridin/ Eisessig/ Wasser: 24 : 30 : 6 : 40

d) Phenol - m-Kresol-Boratpuffer, p_H 8,3

Phenol und m-Kresol werden im Gewichtsverhältnis 1:1 gemischt und auf 50 g Gemisch 7,0 ml Boratpuffer zugesetzt.

e) Phenol-Boratpuffer, p_H 8,3 (80:20)

II. Auftrennung von Peptidgemischen aus Partialhydrolysen.

Fingerprintverfahren:

Das Peptidgemisch wird auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 b aufgetragen und nach Besprühen des Papiers mit Coll-Ac-Puffer in der 1.Dimension eine Elektrophorese bei p_H 7,5 und 50-70 V/cm mit dem gleichen Puffer durchgeführt. In der 2.Dimension wird absteigende Chromatographie, meist im Partridge-System, angeschlossen.

Trennung von Partialpeptiden aus DNP-Peptiden:

Das DNP-Peptid wird mit Salzsäure bei 37° bis zu 2 Tagen hydrolysiert. Danach wird die Säure durch Rotationsverdampfen entfernt. Der Rückstand wird mit verdünnter Salzsäure aufgenommen; die α -DNP-Peptide werden mit Äther extrahiert und entweder 1-dimensional im Levy-System aufgetrennt oder im 2-D-Chromatogramm (1.Dimension: Toluolsystem von Levy, 2.Dimension: Phosphatpuffer, p_H 6,0) chromatographiert. Anschließend werden sie vom Papier mit Bicarbonatlösung extrahiert und durch Überführung in Äther gewonnen. Die ϵ -DNP-Lysin-Peptide werden mit Essigester oder n-Butanol extrahiert und im 2-D-Chromatogramm (1.Dimension: Toluolsystem von Levy, 2.Dimension: BEW) voneinander getrennt. Sie werden mit Wasser oder 4%iger Essigsäure vom Papier eluiert.

Die in der wässrigen Phase verbliebenen wasserlöslichen Peptide werden im Fingerprintverfahren (vgl.oben) oder

1-dimensional in einem der B&W-Systeme oder in Pyridin-Systemen (vergl.oben) aufgetrennt. Sie werden ebenfalls mit Wasser oder 4%iger Essigsäure vom Papier gelöst.

III. Durchführung der Analysen:

Sprühreaktionen: Die Peptide werden am Papier auf ihren Gehalt an Histidin, Arginin, Tryptophan, Prolin und Tyrosin durch Besprühen mit der entsprechenden Reaktionslösung und Entwicklung der Farbreaktion getestet.

Histidin-Nachweis:

Eine 1%ige Lösung von p-Anisidin in Äthanol wird mit 1,9 ml 6 n HCl/100ml versetzt, bei Gebrauch mit 10%iger Amylnitrit-Lösung in Äthanol 1:1 gemischt und nach 3-Minuten zum Besprühen verwendet. Man lässt bei 20° trocknen und entwickelt mit 1.iger äthanolischer KOH.

Tryptophan-Nachweis: Besprühen mit 1% p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung in Aceton bei 60°.

Prolin-Nachweis: Besprühen mit 1%iger Isatinlösung in Äthanol, Entwicklung bei 80-100°.

Arginin-Nachweis: 0,1%ige 8-Hydroxychinolinlösung in Aceton. Nach dem Trocknen Entwicklung mit 0,2 ml Brom in 100 ml 0,5 n Natronlauge.

Ninhydrin-Reaktion:

a) 0,1%ige Lösung: 1 g Ninhydrin wird in 1 lt n Butanol unter Zusatz von 40 ml 2,4,6-Collidin und 300 ml Eisessig gelöst.

b) 0,02%ige Lösung: 200 mg Ninhydrin werden mit 150 ml Wasser versetzt und mit n-Butanol auf 1 lt aufgefüllt.

Totalhydrolysen:

Das gereinigte Peptid wird getrocknet, mit 0,3-1,0 ml 5,7 n HCl (2x dest.) aufgenommen, unter Vakuum oder Stickstoff im Glasröhrchen eingeschmolzen und bei 100-110° 12-48 h total hydrolysiert. Die Salzsäure wird im Vakuum entfernt und der Rückstand auf enthaltene Aminosäuren analysiert. DNP-Peptide werden dagegen mit 12 n HCl, p.A.. 6-16 h bei 100-105° behandelt.

Identifizierung der wasserlöslichen Aminosäuren im 2-D-Chromatogramm.

Das Totalhydrolysat wird auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 b oder Whatman 1 aufgetragen und in der 1. Dimension mit BLW 24 h entwickelt und in der 2. Richtung mit Phenol-Borat-Puffer, pH 8,3 16-20 h chromatographiert.

Identifizierung der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren im 2-D-Chromatogramm.

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung werden die DNP-Aminosäuren in der 1. Dimension mit dem Toluol-System von Levy:

Toluol, Pyridin, Chloräthanol, NH_3 (0,8 n)

5 : 1,5 : 3 : 3

24 h und in der 2. Dimension mit 1,5 m Phosphatpuffer, pH 6,0 (1 m Na_2HPO_4 + 0,5 m Na_2HPO_4) 16 h aufgetrennt.

IV. Umsetzung mit FDNB

a) nach Sanger: Die ins DNP-Derivat zu überführende Substanz wird mit 0,5 ml Wasser gelöst, 0,043 g NaHCO_3 zugesetzt und bei Zimmertemperatur 0,05 ml FDNB

gelöst in Äthanol, hinzugefügt. Man schüttelt 2-3 h bei 25° und trocknet die Lösung durch Rotationsverdampfen ein. Der Überschuß an Reagens wird im alkalischen mit Äther extrahiert. Nach Ansäuern werden die DNP-Aminosäuren mit Äther gewonnen. DNP-Peptide werden vom DNPOH in der Ätherfraktion durch 1-D- oder 2-D-Chromatographie in den Levy-Systemen getrennt. Die nicht im Äther löslichen DNP-Peptide werden durch Extraktion mit Essigester, Essigester/Äther (1:1) oder durch Extraktion mit n-Butanol oder sec-Butanol erhalten.

b) nach Levy: Die Substanzen werden in 2 ml Wasser gelöst, mit Natronlauge im Autotitrator auf p_H 9,0 eingtitriert und unter Zusatz von 0,05-0,1 ml FDNB bei 40° 1-2 h zur Reaktion gebracht. Partial-Peptide, die nur in geringen Mengen anfallen, werden zur Bestimmung ihrer N-terminalen Aminosäure stattdessen in weniger Wasser gelöst, mit p_H -Papier auf p_H 9,0 eingestellt und bei 40° mit 0,05 ml FDNB ohne automatische p_H -Regelung zur Reaktion gebracht. Das p_H der Lösung wird mit 0,1 n Natronlauge nachgestellt.

V. Pufferlösung für die enzymatischen Partialhydrolysen:

Das Peptid wird mit Borat-HCl-Puffer nach Sörensen, der mit Wasser 10-fach verdünnt worden ist, gelöst und das gewünschte p_H durch Zusatz einiger Tropfen 0,1 n Natronlauge eingestellt.

Borat-HCl-Puffer:

Lösung 1: 12,4 g H_3BO_3 und 100 ml 1 n NaOH aufgefüllt auf 1 lt.

Lösung 2: 0,1 n HCl

Lösung 1 und Lösung 2 werden im Verhältnis 6:4 gemischt, sodaß das p_H der Pufferlösung 8,3 beträgt. Dann wird die Pufferlösung 1:10 verdünnt.

Präparate zur enzymatischen Hydrolyse

Trypsin, 2 x krist. + 50% $MgSO_4$:

Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey.

Subtilisin: 3 x krist., wässrige Suspension: "

Pepsin: 2 x krist., Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio.

Chymotrypsin: Nutritional Biochemicals Corp, Cleveland...

VI. Abbaumethoden nach Edman:

Edmanscher Abbau in der Lösung:

Das Peptid wird in 4 ml Pyridin-Wasser 1:1 gelöst, mit 0,1 n Natronlauge auf p_H 9,0 im Autotitrator eingestellt, mit 0,2 ml einer Phenylisothiocyanat-Lösung in Dioxan (1:10) versetzt und bei 40° 1 1/2 h zur Reaktion gebracht. Anschliessend wird die Lösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 5 x mit Benzol (p.A.) zur Entfernung des Reagens-Überschusses extrahiert und zur Trennung der Schichten zentrifugiert. Die untere Phase wird rotationsverdampft, über Nacht über KOH und Paraffin getrocknet und 6 h - 12 h sauer mit 4 ml Eisessig, ges. mit Salzsäure cyclisiert. Danach wird die Lösung rotationsverdampft, die Hydantoine werden durch dreimalige Extraktion mit Äther (peroxydfrei) abgetrennt und die wässrige Phase wird getrocknet. Anschliessend wird ein Teil zur Analyse total hydrolysiert und das Restpeptid erneut der gleichen Abbaumethode unterworfen.

Edmanscher Abbau am Papier:

Papierstreifen-Methode nach Fraenkel-Conrat:

Der Papierstreifen (Grösse: 1 x 4 cm), der etwa 0,1-0,2 μ mol Peptid enthält, wird mit einer frischen 20%igen Lösung von Phenylisothiocyanat in peroxydfreiem Dioxan 2 x befeuchtet. Die noch feuchten Streifen werden in einen Exsiccator, der 50 ml Pyridin, bzw. 50 ml Dioxan und 50 ml Wasser in drei Bechergläsern enthält, bei 40° 3 h dem basischen Milieu ausgesetzt und anschliessend über conc. Schwefelsäure im Hochvakuum getrocknet. Auf die Identifizierung der gebildeten Hydantoine der N-terminalen Aminosäuren kann zunächst verzichtet werden. Das durch Elution mit Wasser vom Papier gewonnene Restpeptid wird mit 5,7 n HCl 12 h bei 105° zur Analyse total hydrolysiert.

Peroxydfreies Dioxan wird durch 6-stündiges Erhitzen über festem FeSO_4 , Trocknen über CaCl_2 und Abdestillieren über festem FeSO_4 erhalten.

B. Durchführung der Versuche an den einzelnen tryptischen Globinpeptiden.

Histidin-Tetra-Peptid

Durchführung der Analyse:

1. Reinigung des Peptides:

- a) 1-D-Chromatogramm, absteigend in BEW, 2 Tage Laufzeit (äquilibrieren 6 h). R_F -Wert: kleiner als der des Cysteins.
- b) Elektrophorese in Py-Ac-Puffer, p_H 6,3 bei 100 V/cm und 15 mA, Zeit: 40 Min. R_F -Wert 0,97-0,98 bez. auf Lysin = 1, kathodisch.

2. Elution: Das Peptid wird mit 4%iger Essigsäure vom Papier eluiert.
3. Totalhydrolyse: 5,7 n HCl, 110° 23 h.
4. Nachweis der Aminosäuren:
 - a) durch 2-D-Chromatographie (siehe oben)
 - b) säulenchromatographisch nach der Methode von Stein und Moore.
5. Totalhydrolyse des DNP-Peptids: 12 n HCl, 12 h, 105° . Das Hydrolysat wird nach Entfernung der Salzsäure mit Äther extrahiert und die darin lösliche N-terminale Aminosäure im 2-D-Chromatogramm nach Levy (vergl.oben) identifiziert. Die wasserlöslichen Aminosäuren werden im 2-D-Chromatogramm aufgetrennt.

Partialhydrolysen:

1. 1 ~~μ~~mol Peptid wird mit 12 n HCl bei 37° im eingeschmolzenen Röhrchen 44 h behandelt. Die Auftrennung der Partialpeptide wird nach dem Fingerprintverfahren (Abb.5) durchgeführt. Sie werden durch Besprühen mit 0,02%iger Ninhydrinlösung und Entwicklung bei 80-100° sichtbar gemacht und vom Papier mit 4%iger Essigsäure eluiert. Die Totalhydrolyse der Partialpeptide wird mit 5,7 n HCl 15 h bei 100° durchgeführt.
2. Das DNP-Peptid wird im Vakuum getrocknet und zur Partialhydrolyse 1,5 ~~μ~~Mol mit rauchender Salzsäure 15 Minuten am Rückfluss erhitzt. Danach wird die Lösung mit Wasser verdünnt, 3 x rotationsverdampft, mit 1 n HCl aufgenommen und zur Extraktion der DNP-Aminosäure mit Äther extrahiert. Die wasserlöslichen ϵ -DNP-Lysin-Peptide werden im 2-D-Chromatogramm (1.Dimension:Levy-System, 2.Dimension BEW) aufgetrennt und nach Elution mit Wasser mit 12 n HCl 12 h bei 100° total hydrolysiert.

Tryptophan-Penta-Peptid

Durchführung der Analyse:

1. Reinigung des Peptides:

- a) Elektrophorese in Py-ac-Puffer, p_H 6,3, bei 100 V/cm 20 mA, Zeit: 40 Min. R_F -Wert: 0,53-0,56 (bez. auf Lysin = 1), kathodisch.

Bei Elution des Peptides mit 20%iger Essigsäure wird es teilweise zerstört. Es wird mit Wasser eluiert und die Lösung kalt rotationsverdampft.

- b) Chromatographie in BEW, 1-dimensional- absteigend (12 stündiges Äquilibrieren), Laufzeit: 2 Tage.

R_F -Wert in BEW wie Asp.

2. Totalhydrolyse: 0,6 μ mol Peptid, 2 ml 5,7 n HCl, 48 h unter Stickstoff bei 110°.

3. Identifizierung der Aminosäuren:

Durch 2-D-Chromatographie und säulenchromatographisch nach der Methode von Stein und Moore.

4. Totalhydrolyse des DNP-Peptids: 2 ml 12 n HCl, 15 h bei 100°. Die DNP-Aminosäure wird wie oben beschrieben mit Äther extrahiert und im 2-D-Chromatogramm nach Levy ermittelt. Die wasserlöslichen Aminosäuren werden nach Levy in ihre DNP-Derivate überführt und nach Trennung im 2-D-Chromatogramm quantitativ bestimmt.

Partialhydrolysen:

1. Chymotryptische Hydrolyse: Etwa 4 μ mol Peptid werden in 2 ml Wasser aufgenommen und im Autotitrator mit 1 n Natronlauge auf p_H 8,0 eintitriert. 250 γ Chymotrypsin, gelöst in 0,13 ml Wasser, werden bei 37° 20 min. zur Einwirkung gebracht. Nach Zusatz eines Tropfens 20%iger Essigsäure wird die Lösung rotationsverdampft. Die Partialpeptide werden elektrophoretisch in Py-ac-Puffer.

pH 6,3 bei 100 V/cm und 20 mA 30 min. aufgetrennt. Sie werden durch Besprühen mit 0,02%iger Ninhydrinlösung schwach sichtbar gemacht und in Wasser eluiert. Die Totalhydrolyse der beim Versuch entstandenen drei Produkte (12 n HCl, 12 h bei 105°) ergibt:

C ₁	:	R _F -Wert	0,18	(bez. auf Lys = 1)	:	Ala, Try
C ₂	:	"	0,8	" " "	:	Gly, Lys
C ₃	:	"	0,53	" " "	:	Ala, Gly, Lys, Try.

Produkt C₃, welches das Restpeptid darstellt, verschwindet im Pherogramm nahezu nach einer Fermenteinwirkung von 3 1/2 h und ist nicht mehr nachweisbar, wenn man den Enzymansatz 4 - 5 h durchführt.

Hydrazinolyse von Partialpeptid C₁: Das Peptid wird mit 0,15 ml wasserfreiem Hydrazin eingeschmolzen und bei 100° incubiert (2 h). Danach wird das überschüssige Reagens im Hochvakuum über konzentrierter Schwefelsäure entfernt und die freie C-terminale Aminosäure mit Wasser auf das Chromatogramm übertragen, das mit BEW entwickelt wird. Anschliessend wird es mit 0,1%iger Ninhydrinlösung sichtbar gemacht.

Analyse von C₂: Das Peptid wird vom Papier mit Wasser eluiert und in 5,7 n HCl 1 h bei 100° total hydrolysiert. Die Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm mit BEW bestimmt.

2. Subtilisinspaltung: 2 µMol Peptid werden im Vakuum eingetrocknet und in 1 ml verdünnter Borat-HCl-Pufferlösung (vergl. oben), pH 8,0, gelöst. 100% Ferment werden in 0,1 ml Wasser gelöst, hinzugefügt und die Reaktionslösung 2 h bei 37° incubiert. Zur Zerstörung der Fermentaktivität wird ein Tropfen 20%ige Essigsäure zugefügt und die Lösung rotationsverdampft. Die Partialpeptide werden im Fingerprint (vergl. Abb. 6) aufgetrennt

und mit 0,02%iger Ninhydrinlösung sichtbar gemacht. Ausserdem werden sie mit Ehrlich's Reagens besprüht. Sie werden mit Wasser eluiert und mit 5,7 n HCl 15 h bei 100° total hydrolysiert. Die Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm in BEW identifiziert.

3. Edman-Abbau: Der stufenweise Abbau des Peptides mit Phenylisothiocyanat wird entsprechend obiger Vorschrift in Lösung ausgeführt. Es werden 1,8 μ Mol Pentapeptid eingesetzt und die Cyclisierung im sauren milieu beim 1.Schritt 6 h, bei der zweiten Abbaustufe 16 h ausgeführt.

Phenylalanin-Heptapeptid.

Durchführung der Analysen:

1. Reinigung des Peptids:

- a) Aus Fraktion 5a der säulenchromatographischen Verteilung wird das Peptid durch 1-D-Chromatographie, absteigend in BEW gewonnen, (Laufzeit : 2 1/2 Tage, äquilibrieren 12 h), der R_F -Wert in BEW ist vergleichbar mit dem des Thr.
- b) Elektrophorese in Py-Ac-Puffer, p_H 6,3 bei 100V/cm und 25 mA, 1 bis 2 h. R_F -Wert = 0,24 bz. auf Lys = 1, kathodisch.
- c) Elektrophorese mit Coll-Ac-Puffer, p_H 7,5 bei 100V/cm und 40 mA, 2 1/2 h.

Das Peptid wird jeweilig mit 4%iger Essigsäure vom Papier eluiert und anschliessend durch Rotationsverdampfen in der Kälte gewonnen.

2. Totalhydrolyse: 0,5 μ Mol Peptid, 24 h bei 100° mit 2 ml 5,7 n HCl im Vakuum.

3. Identifizierung der Aminosäuren: im 2-D-Chromatogramm am Papier und säulenchromatographisch nach der Methode von Stein und Moore.

4. Totalhydrolyse des DNP-Peptids: in 12 n HCl 12 h bei 100°. Nach Extraktion der DNP-Aminosäure mit Äther und Ermittlung im 2-D-Chromatogramm nach Levy werden die wasserlöslichen Aminosäuren nach Sanger in ihre DNP-Derivate überführt und nach der Levy-Methode quantitativ bestimmt.

Partialhydrolysen:

1. Die unspezifische Hydrolyse mit 12 n HCl wird mit 2 ml Säure 30 h bei 37° im eingeschmolzenen Röhrchen durchgeführt und die gebildeten Partialpeptide im Fingerprint (vergl. Abb. 8) getrennt. Sie werden mit 0,02%iger Ninhydrinlösung schwach sichtbar gemacht, mit 4%iger Essigsäure eluiert und mit 5,7 n HCl 12 h bei 105° total hydrolysiert.

Die Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm mit BEW ermittelt. Ihre N-terminale Aminosäure wird durch Edman-Abbau am Papier (vergl. oben) und nach der DNP-Methode (Überführung ins DNP-Derivat nach Sanger) geprüft.

2. Subtilisinspaltung:

2 μ mol Peptid werden in verdünntem Borat-HCl-Puffer gelöst und 1 Stunde bei 37° mit 100% Ferment behandelt. Die gebildeten Partialpeptide werden im Fingerprint (vergl. Abb. 9) getrennt und mit 0,02%iger Ninhydrinlösung entwickelt. Zur Totalhydrolyse werden sie mit 4%iger Essigsäure eluiert und mit 5,7 n HCl 12 h bei 105° eingeschmolzen. Die Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm in BEW bestimmt.

Die N-terminalen Aminosäuren der einzelnen Peptide werden durch einmaligen Edman-Abbau am Papier und nach der DNP-Methode (Überführung ins DNP-Derivat nach Sanger und Levy) ermittelt.

Präparative Isolierung von Spaltprodukt S₈: Der Fermentansatz wird unter den gleichen Bedingungen mit 4 μ Mol Peptid wiederholt und das erhaltene Peptidgemisch statt im Fingerprintverfahren mit BzW 1 1/2 Tage 1-dimensional, absteigend chromatographiert. Peptid S₈ wandert mit einem R_F-Wert wie Phe und wird mit 4%iger Essigsäure vom Papier eluiert. Es wird zur Partialhydrolyse im Vakuum getrocknet und mit 2 ml 12 n HCl 30 h bei 37° eingeschmolzen. Die Lösung wird rotationsverdampft und die gebildeten Spaltprodukte im 1-D-Chromatogramm in BzW aufgetrennt. Sie werden mit 0,02%iger Ninhydrinlösung sichtbar gemacht und mit 4%iger Essigsäure eluiert. Nach Trocknen werden sie mit 5,7 n HCl 13 h bei 105° total hydrolysiert. Peptid S₈ (3) wird nach Levy ins DNP-Derivat überführt und dieses durch Chromatographie 1-dimensional, absteigend in 1,5 m Phosphatpuffer nach Levy von DnPOH abgetrennt (Laufzeit 10 h). Es wird mit 1%iger Bicarbonatlösung 15 Min. bei 55° eluiert (Blindwert entsprechend behandelt) und seine maximale Extinktion ermittelt:

Messergebnisse:

m μ :	330	350	360	370	375	380	385	390
E :	0,420	1,120	1,325	1,500	1,510	1,540	1,485	1,375.

Danach liegt das Extinktionsmaximum des DNP-Peptids bei 380 m μ . Das 1-D-Chromatogramm der wässrigen Aminosäure (nach Totalhydrolyse des DNP-Peptids 8 h mit 5,7 n HCl bei 105°) liefert nach Entwicklung in BzW (30 h) Val.

3. Pepsinspaltung:

2 μ Mol Peptid werden in n/16 HCl gelöst und mit 100 γ Ferment 3 h bei 37° behandelt. Die Lösung wird rotationsverdampft und zur Auftrennung ein Fingerprint bei 92 V/cm 39 m A 55 Min. durchgeführt (2.Dimension:BzW). Besprühen

mit 0,02%iger Ninhydrinlösung macht zwei Produkte sichtbar:

P_2 : R_f -Wert in BEW wie Lysin. Es wird total hydrolysiert wie üblich und im 1-D-Chromatogramm in BEW Lys nachgewiesen.

P_1 : R_f -Wert wie Gly, enthaltene Aminosäuren nach Totalhydrolyse und 1-D-Chromatographie in BEW : Val xx, Asp xx, Pro x, Phe x, (Spuren Lys).

Untersuchung von Peptid P_1 : 0,5 μ Mol des isolierten Peptides werden in verdünnter Borat-HCl-Lösung bei p_H 8,0 mit 50% Carboxypeptidase, gelöst in 0,3 ml 10%iger LiCl-Lösung, versetzt. Die enzymatische Hydrolyse wird 6 h bei 25° im dunklen Exsiccator durchgeführt und danach zur Zerstörung der Fermentaktivität ein Tropfen 20%ige Essigsäure zugesetzt. Die Spaltprodukte werden im Fingerprint bei 87 V/cm und 40 mA 40 min. getrennt, wobei in der 2. Dimension BEW verwendet wird. Die erhaltenen Produkte werden mit 4%iger Essigsäure eluiert und mit 5,7 n HCl 14 h bei 100° total hydrolysiert. Sie liefern folgende Aminosäuren, die in BEW 1-Dimensional ermittelt werden:

C_R : R_f -Wert wie Glu in BEW: enthält: Val xx, Asp xx, Pro x.

C_{R2} : R_f -Wert wie Phe in BEW: enthält: Phe.

Carboxypeptidase-Peptid C_R wurde mit Subtilisin zu spalten versucht: Es wurde mit verdünnter Borat-HCl-Pufferlösung gelöst und unter Zusatz von 50% Ferment 2 h bei 37° behandelt. Der Fingerprint der erhaltenen Lösung (Durchführung analog wie oben, Elektrophoresedauer nur 20 Min.) ergab das gleiche Peptid C_R zurück.

Das Hexadeca-Peptid

Durchführung der Analyse:

1. Reinigung des Peptids:

- a) Chromatographie in BEW , 2 1/2 Tage (6 h äquiliibriert)
R_F-Wert wie Prol in BEW.
 - b) Pherographie in Py-Ac-Puffer, p_H 6,3
2 h bei 92 V/cm, 39 mA
R_F-Wert = 0,2 (bez. auf Lys = 1) kathodisch.
 - c) Pherographie in Coll-Ac-Puffer, p_H 7,6,
100 V/cm 30 mA, 2 1/2 h ,
Elution jeweilig mit 4%iger Essigsäure.
2. Totalhydrolyse des Peptids: 2 ml 5,7 n HCl, 110° , 20 h,
(eingeschmolzen eingefroren, im Vakuum)
3. Nachweis der Aminosäuren:
- a) durch 2-D-Chromatographie am Papier
 - b) säulenchromatographisch nach Stein und Moore.
4. Nachweis der DNP-Aminosäuren:
- 1 μ Mol elektrophoretisch gereinigtes Peptid wird nach Totalhydrolyse (mit 5,7 n HCl 22 h bei 105°) mit FDNB nach Sanger zur Überführung in die DNP-Aminosäuren behandelt und die Aminosäuren im 2-D-Chromatogramm quantitativ nach Levy bestimmt.
5. Totalhydrolyse des DNP-Peptids:

4 μ Mol elektrophoretisch gereinigtes Peptid werden nach Levy mit FDNB in das DNP-Derivat überführt. Zur Entfernung des Überschusses an Reagens wird die Lösung im alkalischen mit Äther extrahiert und durch Extraktion mit Äther im sauren das DNPOH entfernt. Das DNP-Peptid wird durch Extraktion mit Essigester gewonnen und durch Rotationsverdampfen im Vakuum getrocknet. Totalhydrolyse: 12 n HCl, 30 h , 37°.

Partialhydrolysen:

Die Partialhydrolyse mit Chymotrypsin wird mit 4 μ Mol elektrophoretisch gereinigtes Peptid durchgeführt, die in 1,5 ml verdünnter Borat-HCl-Pufferlösung durch zweistündiges Stehen bei 37° vollständig in Lösung gebracht und mit 150 μ g Ferment 4 h bei 37° behandelt werden. Nach der Zerstörung der Fermentaktivität wird die Lösung kalt rotations-verdampft. Die erhaltenen Partialpeptide werden auf 6 bis 8 Schleicher-Schüllbogen 2043 b (30 cm breit) aufgetragen und 1-dimensional-absteigend in modifiziertem BAW (3:1:1) 16 n chromatographiert. Rechts und links werden Probestreifen mit 0,1%iger Ninhydrinlösung entwicelt und die den drei gefärbten Flecken entsprechenden Banden mit 4%iger Essigsäure 16 n eluiert. Die drei chymotryptischen Partialpeptide werden folgendermassen gereinigt und analysiert:

Chymotrypsinpeptid C₃:

R_F-Wert in BAW (3:1:1) 1,25 bez. auf Leu = 1. Ninhydrinfarbe: violett. Es wird durch Elektrophorese in Py-Ac-Puffer, pH 6,3 (1 h bei 50 V/cm und 30 mA) nachgereinigt und mit 4%iger Essigsäure eluiert. Nach Trocknen im Vakuum werden 0,5 μ Mol Peptid C₃ mit 2 ml 5,7 n HCl 22 h (eingefroren eingeschmolzen im Vakuum) bei 105° total hydrolysiert. Keine Aminosäuren werden quantitativ nach der Methode von Stein und Moore ermittelt (Vergl. Abb. 12).

Chymotrypsinpeptid C₂:

R_F-Wert in BAW (3:1:1) wie Tyr. Es wird durch Elektrophorese in Py-Ac-Puffer, pH 3,6 (2 h bei 50 V/cm) nachgereinigt. Ausserdem wird sein elektrophoretisches Verhalten bei pH 3,6 geprüft (R_F-Wert wie die neutralen Aminosäuren).

Es reagiert im Sprühtest Histidin-positiv und wird vom Papier mit Wasser über Nacht eluiert. Die Totalhydrolyse wird von 0,15 μ Mol Peptid mit 2 ml 5,7 n HCl, 21 h bei 110° (Vak) ausgeführt und die Aminosäuren quantitativ nach der Methode von Stein und Moore bestimmt (vergl. Abb.12).

Chymotrypsinpeptid C₁:

R_F-Wert in BEW (3:1:1) wie Arg. Es wird elektrophoretisch in Py-Ac-Puffer bei p_H 3,6 (50 V/cm und 15 mA, 2 h) und bei p_H 6,4 (2 h bei 70 V/cm und 17 mA) auf Einheitlichkeit geprüft. Das einmal elektrophoretisch nachgereinigte Peptid wird mit 4%iger Essigsäure vom Papier eluiert und in einer Menge von 1 μ Mol mit 2 ml 5,7 n HCl 50 h bei 110° (Vak) total hydrolysiert. Die Aminosäuren werden quantitativ nach der Methode von Stein und Moore bestimmt (Vergl.Abb.12) .

Sequenzanalyse von C₂ und C₁:

Partialhydrolyse des DNP-Hexadeca-Peptids:

Das Hexadecapeptid wird nach Levy ins DNP-Derivat überführt und 4 μ Mol DNP-Peptid werden mit 1,5 ml 12 n HCl 30 h bei 37° im eingeschmolzenen Röhrchen behandelt. Die α -DNP-Peptide werden nach Abtrennung der Salzsäure mit Äther extrahiert und im 1-D-Chromatogramm nach Levy aufgetrennt. Die zwei erhaltenen α -DNP-Peptide werden mit Bicarbonatlösung vom Papier eluiert, durch Extraktion im sauren mit Äther gewonnen und nach Trocknen im Vakuum mit 12 n HCl 20 h bei 105° total hydrolysiert.

Peptid B₂: R_F-Wert im Toluol-System wie DNP-Ala, es enthält DNP Val, Ieu und Gly, wie aus dem 1-dimensionalen Chromatogramm der Aminosäuren in BLW hervorgeht.

Peptid B₁ : R_f-Wert im Toluol-System wie DNP-Leu, es enthält DNP Val und im 1-D-Chromatogramm der wasserlöslichen Aminosäuren in BEW : Leu.

Die wässrige Phase wird anschliessend mit Essigester extrahiert und die ϵ -DNP-Lys-Peptide im 2-D-Chromatogramm (1.Dim.:BEW, 2.Dim.:Toluolsystem nach Levy) aufgetrennt.

Peptid B₆: R_f-Wert im Toluolsystem kleiner als DNP-Gly wird nach Elution mit verd. Essigsäure in 12 n HCl, 14 h bei 105° total hydrolysiert, die Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm mit BEW als Asp, Leu und ϵ -DNP Lys identifiziert.

Die restliche wässrige Phase wird Rotationsverdampft, die enthaltenen Peptide werden in der 1.Dimension elektrophoretisch mit Coll-Ac-Puffer, pH 7,5 (1 h bei 40 V/cm) getrennt und 2 x mit BEW in der 2.Dimension chromatographiert. Dabei wird Produkt B₃ isoliert, das nach Elution mit 4%iger Essigsäure und Totalhydrolyse (mit 5,7 n HCl 16 h bei 105°) Phe und Ala im 1-D-Chromatogramm in BEW ergibt.

Spaltung von C₃ mit Carboxypeptidase:

Dazu wird 1 μ Mol elektrophoretisch gereinigtes Peptid C₃ in 4 ml Wasser gelöst und mit 0,1 n Natronlauge auf pH 8,0 im Autotitrator titriert. 65% Carboxypeptidase, in 0,03 ml 10%iger LiCl-Lösung gelöst, werden bei 30° hinzugefügt; nach 10, 25, 40, 65, 95 Min. werden Proben von je 0,75 ml entnommen, die Fermentaktivität wird sofort durch Zusatz von Essigsäure zerstört und die Lösung eingetrocknet. Die freigesetzten Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm in BEW, 16 h Laufzeit, geprüft. In allen Proben zeigen sich am Chromatogramm 3 Ninhydrinpositive Produkte, die mit 4%iger Essigsäure eluiert und in 5,7 n HCl 16 h bei 110° total hydrolysiert werden!

Produkt C₃₋₁ : R_f in BEW wie Ala, Aminosäuren : Ala

Produkt C₃₋₂ : R_f in BEW wie Phe, " : Phe

Produkt C₃₋₃: R_f in BEW grösser als Leu, Aminosäuren:
Gly, Val, Leu.

Hydrazinolyse von C₃:

1 μ Mol Peptid C₃ wird über KOH und Paraffin getrocknet und mit 0,5 ml wasserfreiem Hydrazin im Röhrchen eingeschmolzen. Es wird 4 h im Wasserdampf erhitzt und anschliessend über conc. Schwefelsäure 48 h im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mit 3-4 Tropfen Wasser versetzt, ein Tropfen iso-Valerylaldehyd hinzugefügt und 30 Min. bei 25° geschüttelt. Dann wird mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und die Hydrazone werden 3 x mit Äther extrahiert. Von der wässrigen Phase wird 1/5 im 1-D-Chromatogramm in Phenol-m-Kresol-Boratpuffer, pH 8,3 auf enthaltene freie Aminosäuren geprüft.

Partialhydrolyse von C₁:

1,5 μ Mol elektrophoretisch nachgereinigtes Peptid C₁ werden nach Levy ins DNP-Derivat überführt, mit Essigester extrahiert und mit 12 n HCl bei 37° 18 h incubiert. Nach Entfernen der Salzsäure wird mit Äther extrahiert, aus dem sich DNP-Asp durch 2-D-Chromatographie nachweisen lässt. Danach wird mit Essigester extrahiert und durch 2-D-Chromatographie (1.Dim.Toluolsystem, 2.Dim.BEW) Peptid B₆ erneut isoliert.

Stufenweiser Edman-Abbau von Peptid C₁:

Etwa 2 μ Mol Peptid C₁, das elektrophoretisch nachgereinigt worden ist, wird wie oben beschrieben in 4 ml Py/Wasser (1:1) gelöst und bei 40° 1 1/2 h im basischen Milieu ins Carbaminsäurederivat überführt. Nach Extraktion mit Benzol wird die Cyclisierung im sauren 6 h bei 25° durchgeführt. Nach Extraktion des Hydantoins wird ein Viertel der Menge zur Analyse mit 2 ml 5,7 n HCl

20 h bei 110° total hydrolysiert und die Aminosäurezusammensetzung quantitativ nach der Methode von Stein und Moore bestimmt. Die Analyse wird an $0,3 \mu\text{Mol}$ Peptid durchgeführt. Die restlichen $3/4$ werden in analoger Weise dem Edmanschen Abbau unterworfen, wobei die Cyclisierung in sauren 16 h durchgeführt wird. Anschliessend wird nach Entfernung der Säure das Hydantoin mit Äther extrahiert und $3/5$ der Menge zur Analyse in 2 ml $5,7 \text{ n HCl}$ 20 h bei 110° total hydrolysiert. Die Aminosäuren werden quantitativ nach der Methode von Stein und Moore bestimmt. Die Analyse wird an $0,4 \mu\text{Mol}$ Peptid durchgeführt. Der Rest der wässrigen Phase wird rotationsverdampft, elektrophoretisch in Py-Ac-Puffer, $p_{\text{H}} 6,4$ bei 100 V/cm 30 Min. gereinigt. Nach Elution mit 4%iger Essigsäure und Trocknen wird das Rest-Dipeptid mit $5,7 \text{ n HCl}$ 20 h bei 110° total hydrolysiert. Nachweis der Aminosäuren im 1-D-Chromatogramm in BEW.

Arginyl-Peptid XX/13

Gewinnung des Peptides:

Stein und Moore-Methode: Es wird aus Gipfel HT_1 durch Pherographie gewonnen²⁵⁾.

Dowex 1 X2-Verfahren: Das Peptid liegt einheitlich in Fraktion XX/13 vor. Es wird in Py-Ac-Puffer, $p_{\text{H}} 6,3$ durch Elektrophorese bei 35 V/cm und 33 mA , 1h, nachgereinigt.

Es wandert mit einem R_{F} -Wert kleiner als Glu anodisch (R_{F} -Wert $0,3$ bez. auf Asp = 1)

Der R_{F} -Wert bei Chromatographie in BEW ist wie der des Gly.

Analysen:

Nach Ingram³²⁾ Asp 1x, Glu 2x, Gly 2x, Ala 1x, Val 2x,
Leu 1x, Arg 1x.

nach Hilse⁹⁾ 1,81 1,74 2,84 1,06 3,04
1,00 1,00

Durchgeführte Versuche:

Überführung in das DNP-Derivat:

5 μ Mol Peptid (elektrophoretisch gereinigt) werden im Autotitrator mit 1,0 n Natronlauge auf p_H 8,0 gebracht und mit 0,15 ml FDNB 60 bis 90 Min. bei 40° zur Reaktion gebracht. Dabei fällt das DNP-Peptid aus. Der Reagensüberschuss wird im alkalischen mit Äther extrahiert und 5 x im sauren mit Äther zur Entfernung des DNPOH behandelt. Das Peptid bleibt ungelöst zurück und wird abzentrifugiert. Es wird mit Äther, Essigester und Wasser gewaschen, abzentrifugiert und getrocknet.

Partialhydrolysen:

1. Das DNP-Peptid wird mit 2 ml 12 n HCl 2 Tage bei 37° im eingeschmolzenen Röhrchen incubiert. Die Salzsäure wird entfernt und die α -DNP-Peptide werden mit Essigester extrahiert. Sie werden 1-dimensional im Toluolsystem nach Levy aufgetrennt und mit 1%iger Bicarbonatlösung vom Papier eluiert, in Essigester überführt, rotationsverdampft und mit 12 n HCl 8 h bei 105° total hydrolysiert. Folgende Aminosäuren werden im 1-D-Chromatogramm der Totalhydrolysate in BEW ermittelt:

- DNP-Peptid A₁ : R_F -Wert im Toluolsystem wie Asp
Aminosäuren: DNP Val-(Asp, Glu, Val xx)
DNP-Peptid A₂ : R_F -Wert im Toluolsystem kleiner als
DNP-Ser (= 0,38 bez.auf DNP-Leu = 1)
Aminosäuren: DNP-Val-Asp.

DNP-Peptid A₃ : R_F-Wert im Toluolsystem wie DNP-Val
Aminosäuren: DNP-Val- (Asp, Val).

Die Versuche können durch Partialhydrolyse mit 12 n HCl nach 4 Tagen Hydrolysedauer bei 37° reproduziert werden. Das Peptid A₃ (DNP-Tripeptid) wird aus DNP-Peptid A₁ durch Behandlung mit 12 n HCl 40 h bei 55° gebildet.

2. Subtilisin-Spaltung:

Das DNP-Peptid (Gesamtpeptid) wird mit verdünnter Borat-HCl-Pufferlösung bei p_H 8,0 gelöst und mit 100 γ Ferment 12 h bei 37° im Dunklen behandelt. Die Reaktionslösung wird angesäuert. Die erhaltenen DNP-Peptide werden daraus mit Essigester extrahiert und im 1-D-Chromatogramm mit dem Toluulgemisch aufgetrennt. Dabei wird nur ein Peptid (S₁) isoliert, das den gleichen R_F-Wert wie DNP-Val hat und nach der Totalhydrolyse (in 12 n HCl, 8 h bei 100°) die Aminosäurezusammensetzung von Peptid A₃ zeigt:
DNP Val- (Asp, Val).

Subtilisin-Peptid S₁ wird mit 1 ml verdünnter Borat-HCl-Pufferlösung, p_H 8,3 gelöst und mit 200 γ Carboxypeptidase die in 10%iger LiCl-Lösung gelöst werden, versetzt. Nach 12 stündiger Einwirkungszeit bei 25° im dunklen Exsiccator wird die Lösung angesäuert und mit Äther extrahiert. Das entstandene DNP-Peptid wird 1-dimensional im Toluolsystem chromatographiert und zeigt nun einen R_F-Wert wie DNP-Peptid A₂. (0,38 bez.auf Leu = 1) Auch seine Aminosäurezusammensetzung stimmt mit diesem Produkt überein: DNP-Val-Asp. Entsprechend wird im 1-D-Chromatogramm der wässrigen Phase mit BEW die durch Carboxypeptidase abgespaltene Aminosäure: Val neben Spuren von Asp nachgewiesen. Die Sequenz am N-terminalen Ende des Arginyl-Peptids XX/13 muß daher lauten:

Val-Asp-Val-....

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Methoden zur Hydrolyse des Globins aus Human-Hämoglobin A mit Trypsin und zur präparativen Isolierung der entstandenen Spaltprodukte für die Sequenzanalyse werden diskutiert.
2. Am Beispiel einiger tryptischer Globinpeptide werden die Methoden zur Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren und die Kombination derselben untersucht.
3. Die Sequenzanalyse wurde am Beispiel eines Tetra-, Penta- und eines Hepta-Peptides aus Human Hämoglobin durchgeführt und ausserdem die N-terminale Sequenzfolge an einem Arginin-Peptid, das 13 Aminosäuren enthält, bestimmt. Die Partialformel eines aus 16 Aminosäure-Resten bestehenden Peptides wird angegeben.
Die ermittelten Teilsequenzen des Globins lauten:
Ala-His-Gly-Lys
Ala-Ala-Try-Gly-Lys
Val-Asp-Pro-Val-Asp-Phe-Lys
Val-Asp-Val-....
Val-Leu-Gly-Ala-Phe- (His,Leu,Ser,Gly,Asp,Ala,Leu)
-Asp-Asp-Leu-Lys.
4. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die Konstitutionsermittlung der Gesamtstruktur des menschlichen Hämoglobins werden diskutiert.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Brand E., Edsall J.T., Ann.Rev.Biochem.16, 224, 1947
- 2) Svedberg T., Fahraeus R., J.Am.Chem.Soc.48,430, 1926
- 3) Roche J., Roche A., Adair G.S., Adair M.E.,
Biochem. J. 26, 1811, 1932
- 4) Perutz M.F., Trotter J.F., Howells L.K., Green D.W.,
Acta crystall. VII, 241, 1955
- 5) Ingram D.J.E., Gibson J.F., Perutz M.F.,
Nature 178, 905, 1956
- 6) Braunitzer G., Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.
312, 72, 1958
- 7) Reichmann M.E., Colvin J.R., Canad.J.Chem.34,411,1956
- 8) Hilse K., Braunitzer G., Z. Naturf. 14b, 603,1959
- 9) " " "14b, 604, 1959
- 10) Liebold B., Hilse K., Simon K., Braunitzer G.,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 278, 1959
- 11) Rudloff V., Braunitzer G.,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. , im Druck
- 12) Liebold B., Braunitzer G.,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 271, 1959
- 13) Anson M-L., Mirsky A.L., J.Gen.Physiol.13, 469, 1930
- 14) Kleczkowski A. , Biochem. J. 38, 160, 1944
- 15) Hirs C.H.W., Moore S., Stein W.H.,
J. Biol. Chem. 219, 623,1956

- 16) Jolles P., Jolles J., C. R., hebdomadaire Séances Acad. Sci.
246, 1109, 1958
- 17) Rossi-Fanelli A., Cavallini D., de Marco C.,
B.B.A. 17, 377,
Stein W.H., Kunkel H.G., Cole R.D., Spackman D.H.,
Moore S., B.B.A. 24, 640, 1957
- 18) Redfield R.R., Anfinsen C.B., J. Biol. Chem.
221, 385, 1956
- 19) Levy L., Li C.H., J. Biol. Chem. 213, 487, 1955
- 20) Moore S., Stein W.H., J. Biol. Chem. 211, 907, 1954
" " , Hirs C.H.W., " 219, 627, 1956
- 21) Fraenkel-Conrat H., Harris J.I., Levy A.L., "Methods
of Biochem. Anal." II, 393, Intersc. Publ., New York, 1955
- 22) Braunitzer G., Chem. Ber. 88, 2025, 1955
- 23) Ingram V.M., Nature 178, 792, 1956
B.B.A., 28, 539, 1958
- 24) Liebold B., Diplomarbeit Tübingen 1958
- 25) Hilse K., Diplomarbeit München 1959
- 26) Partridge S., Westall R.G., Biochem. J. 42, 238, 1948
- 27) Levy A.L., Nature 174, 126, 1954
- 28) Fraenkel-Conrat H., Harris J.I., Levy A.L., "Methods
of Biochem. Anal." II, 363, Intersc. Publ., New York, 1955
- 29) Stein W.H., Moore S., Spackman D.H., Anal. Chem.
30, 1190, 1958
- 30) Bergmann M., Fruton J.S., Adv. in Enzym. 1, 63, 1941
Sumner J.B., Myrbäck K., "The Enzymes", Acad. Press
Inc., New York, 1951, Vol. I Part 2, 793
- 31) Harris J.I., Roos P., Biochem. J. 71, 434, 445, 451, 1959
- 32) Ingram V.M., Biochem. Kongress, Wien, 1958

L e b e n s l a u f

Als zweite Tochter des Apothekers Dr. Georg Liebold und seiner Ehefrau Dr. Friedel Liebold , geb. Richter, wurde ich am 28.3.31 in Gotha/ Thüringen geboren. Von 1937 bis 1941 besuchte ich in Hannover die Bürgerschule 30 und wurde dann auf die Sophienschule, Städtische Oberschule für Mädchen in Hannover umgeschult. Von 1943 bis 1945 besuchte ich das Lyzeum in Bünde/ Westf. und legte am 2.3.1950 an der Sophienschule in Hannover die Reifeprüfung ab.

Am 2.5.1950 immatrikulierte ich mich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Hochschule in Giessen und studierte dort Botanik. Im Sommersemester 1951 wechselte ich an die Universität in Innsbruck und begann dort Chemie zu studieren. Ab Sommersemester 1952 setzte ich das Chemiestudium an der Universität in Tübingen fort und legte dort am 3.11.1953 die Diplom-Vorprüfung für Chemiker und am 20.7.1956 die Hauptprüfung für Chemiker ab. Im Wintersemester 1956 wechselte ich an die Universität in München . Meine Diplom- und Doktorarbeit führte ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt im Max-Planck-Institut für Biochemie in München aus.

